

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Stanovení hladin železitých iontů v SIA systému
s chemiluminiscenční detekcí**

**Determination of ferric ions in the SIA system
with chemiluminescence detection**

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Michaela Blahynková

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Práce byla vypracována v souladu se Studijním a zkušebním řádem Univerzity Karlovy v Praze a v souladu s Pravidly pro organizaci studia na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

V Hradci Králové dne.....

.....

Michaela Blahynková

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce Doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za odborné vedení, rady, vstřícnost, trpělivost a hlavně čas, který mi věnovala při vypracování této práce. Dále bych ráda poděkovala i ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie za vytvoření vhodných podmínek pro realizaci experimentální části diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Michaela Blahynková

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení hladin železitých iontů v SIA systému s chemiluminiscenční detekcí

Bylo sledováno katalytické působení železitých iontů na oxidaci luminolu peroxidem vodíku v bazickém prostředí pomocí chemiluminiscenční detekce. Optimalizována byla sekvence aspirace vzorku a činidel, jejich objemy, rychlosti mísení a průtoku detektorem. Také byl zkoušen vliv promísení, různých železitých sloučenin a přítomnost železnatých iontů na intenzitu chemiluminiscence. Výsledky optimalizace byly sekvence aspirace 50 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 50 μl luminol $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Aspirace roztoků probíhala při $100 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$, rychlost průtoku detektorem byla $70 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. Kalibrační závislost intenzity chemiluminiscence na koncentraci železitých iontů při nízkých koncentracích ($10^{-7} - 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) byla nelineární. Lineární oblast kalibrace Fe^{3+} iontů za standardních podmínek nebyla nalezena s dostatečně vysokým korelačním koeficientem, proto byla použita polynomická kalibrační závislost druhého řádu s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9785$. Byl vypočítán detekční limit, který se rovná $7,48\cdot 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} iontů, hodnota kvantifikačního limitu je $1,26\cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} iontů. Pro koncentraci $2\cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} iontů za standardních podmínek je opakovatelnost hodnocená jako relativní směrodatná odchylka rovna 3,79 %. Pro koncentraci $4\cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} iontů za standardních podmínek je relativní směrodatná odchylka rovna 6,28 %.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Michaela Blahynková

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Determination of ferric ions in the SIA system with chemiluminescence detection

Catalytic influence of ferric ions on the oxidation of luminol using hydrogen peroxide in alkaline environment has been observed through chemiluminescence detection. The sequence of sample and reagent aspiration, their volumes, mixing flow rate and flow rate through the detector have been optimized. The influence of mixing, various ferric compounds, and the presence of ferrous ions on the intensity of chemiluminescence have also been tested. The resulting optimization was an aspiration sequence of 50 μl of $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 , 50 μl of $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 50 μl of $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ luminol. Solution aspiration speed was $100 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$, flow rate through detector was $70 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. Calibration dependence of chemiluminescence intensity on ferric ion concentration at low concentrations ($10^{-7} - 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) was non-linear. Linear area of calibration for Fe^{3+} ions at standard conditions has not been found with correlation coefficient high enough, therefore polynomial calibration dependence of second degree with correlation coefficient of $R^2 = 0.9785$ has been used. Detection limit of $7.48\cdot 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} ions has been calculated and the value of quantification limit is $1.26\cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} ions. For the concentration of $2\cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} ions at standard conditions, repeatability is evaluated as relative standard deviation of 3.79 %. For the concentration of $4\cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} ions at standard conditions, relative standard deviation is 6.28 %.

Seznam zkratek

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AcSHA	salicylamid o-octové kyseliny (N-acetyloxy-2-hydroxybenzamid)
CL	chemiluminiscence
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
HAc-NAAC	acetátový pufr
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně spáženým plazmatem
MSA	2-sulfojantarová kyselina
rFIA	zpětná průtoková injekční analýza (Reverse flow Injection Analysis)
RHA	rhodaminamid
RSD	relativní směrodatná odchylka
SAM	samoorganizační monovrstva
SD	směrodatná odchylka
SIA	sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah	7
1 Úvod	9
2 Cíl a popis zadání práce	10
3 Teoretická část	11
3.1 Sekvenční injekční analýza	11
3.1.1 Princip a popis SIA	11
3.1.2 Uplatnění SIA v praxi	12
3.2 Chemiluminiscence	13
3.2.1 Mechanismus a vznik CL signálu	14
3.2.2 Luminol jako chemiluminiscenční činidlo	16
3.3 Stanovení železitých iontů jinými instrumentálními metodami	17
3.3.1 Stanovení železitých iontů pomocí průtokové injekční analýzy spektrofotometrickou detekcí na základě vzniku komplexů s salicylamidem kyseliny o-octové (AcSHA)	18
3.3.2 Stanovení železitých iontů pomocí zpětné průtokové injekční analýzy spektrofotometrickou detekcí na základě vzniku komplexů s chlortetracyklinem	18
3.3.3 Stanovení železitých iontů pomocí poklesu fluorescence	19
3.3.4 Stanovení železitých iontů pomocí zlaté elektrody modifikované samoorganizačními monovrstvami (SAM) kyseliny 2-sulfojantarové (MSA)	19
4 Experimentální část	21
4.1 Laboratorní přístroje	21
SIA systém s detektorem	21
4.2 Použité chemikálie	21
4.3 SIA systém s detektorem	22
4.3.1 SIA systém	22
4.3.2 Detekce a hodnocení signálu	23
4.4 Příprava roztoků	23
4.4.1 Příprava zásobních roztoků	24
4.4.2 Příprava pracovních roztoků	24
4.5 Optimalizace parametrů	25
4.5.1 Vliv aspirace roztoků na intenzitu CL	25

4.5.2	Vliv rychlosti mísení a průtoku detektorem na intenzitu CL	26
4.5.3	Vliv koncentrace železitých iontů na intenzitu CL	26
4.5.4	Vliv změny napětí na intenzitu chemiluminiscence	26
4.5.5	Vliv objemu činidel na intenzitu CL	26
4.5.6	Vliv promísení na intenzitu CL	26
4.6	Kalibrační závislost.....	27
4.7	Opakovatelnost	27
4.8	Porovnání intenzity CL u různých železitých sloučenin	27
4.9	Vliv železnatých iontů na intenzitu CL při stanovení železitých iontů	27
5	Výsledky měření a diskuse.....	28
5.1	Optimalizace parametrů	28
5.1.1	Vliv aspirace roztoků na intenzitu chemiluminiscence	28
5.1.2	Vliv rychlosti mísení a průtoku detektorem na intenzitu chemiluminiscence	29
5.1.3	Vliv koncentrace železitých iontů na intenzitu chemiluminiscence	38
5.1.4	Vliv změny napětí na intenzitu chemiluminiscence při různých koncentracích železitých iontů	39
5.1.5	Vliv koncentrace železitých iontů a měnící se rychlosti průtoku detektorem na intenzitu chemiluminiscence při napětí 400 V	42
5.1.6	Vliv objemu činidel na intenzitu chemiluminiscence	44
5.1.7	Vliv promísení obrácením směru toku nosného proudu před průchodem detektorem na intenzitu CL.....	48
5.2	Kalibrační závislost.....	50
5.2.1	Kalibrační závislost.....	53
5.2.2	Kvantifikační a detekční limity	53
5.3	Opakovatelnost	54
5.4	Porovnání intenzity CL různých železitých sloučenin	55
5.5	Vliv železnatých iontů na intenzitu CL při stanovení železitých iontů	56
6	Souhrn	57
7	Závěr.....	61
8	Seznam použité literatury	62

1 Úvod

Železo je jedním z nejčastěji stanovovaných analytů z hlediska životního prostředí. V posledních desetiletích získává na významu znalost koncentrace železa, jako jednoho z nejhojněji se vyskytujícího prvku zemské kůry, v přírodních vodách. Hlavní formou železa ve vodách jsou železité ionty, avšak pouze malá část se vyskytuje ve volné hydratované formě. Železnaté ionty, které jsou dobře hydratovatelné, se rychle oxidují na železité ionty [1].

Je mnoho způsobů stanovení a detekce železitých iontů. Pro tuto práci byla vybrána metoda stanovení pomocí sekvenční injekční analýzy. Tato metoda patří mezi moderní průtokové metody. Rychlost, jednoduchost, flexibilita a automatizace zaručuje vysoké využití a uplatnění při stanovení koncentrace analytů. Byla zkombinována s chemiluminiscenční detekcí [2].

2 Cíl a popis zadání práce

Cílem bylo testovat vliv nízkých koncentrací (10^{-7} až 10^{-9} mol·l⁻¹) železitých iontů ve formě hexakynoželezitanu draselného, optimalizovat chemiluminiscenční systém obsahující luminol v zásaditém prostředí hydroxidu sodného, peroxid vodíku a hexakynoželezitanem draselným, zjistit nejvýhodnější sekvenci, objemy činidel, rychlosti mísení a průtoku detektorem a optimalizovat stanovení železitých iontů, lineární rozsah, limity detekce a kvantifikace, opakovatelnost.

Zadáním diplomové práce bylo studovat vliv železitých iontů na chemiluminiscenční systém s peroxidem vodíku a luminolem pomocí systému SIA, který byl sestaven na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

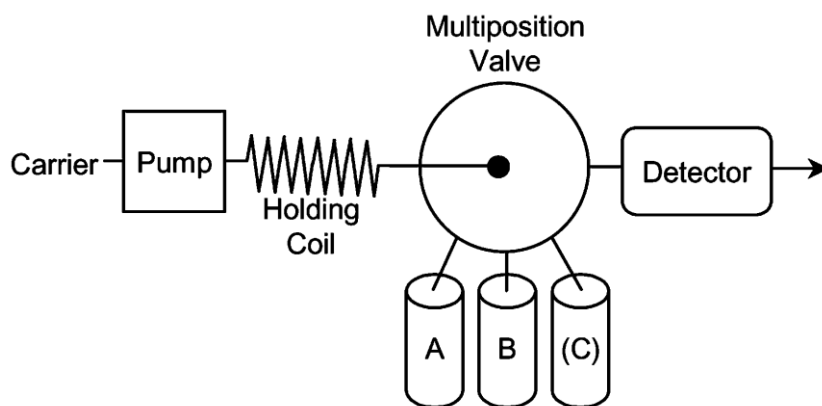
3 Teoretická část

3.1 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) patří do skupiny průtokových analytických metod, které umožňují automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, tím zvyšovat produktivitu zejména rutinních stanovení. Tato metoda byla vyvinuta během odstraňování nevýhod techniky průtokové injekční analýzy (FIA). Nevýhodou SIA by mohla být snížená frekvence dávkování vzorku a nutnost složité počítačové techniky. Nesporné výhody jsou viděny v tom, že analýza probíhá v jednokanálovém uspořádání s jedním ventilem a jedním čerpadlem. Čas pohybu pístu čerpadla určuje objemy aspirovaných roztoků. Tyto postupy vedou k optimalizaci reakčního času, úspoře činidel, eliminaci interferujících signálů pozadí [2].

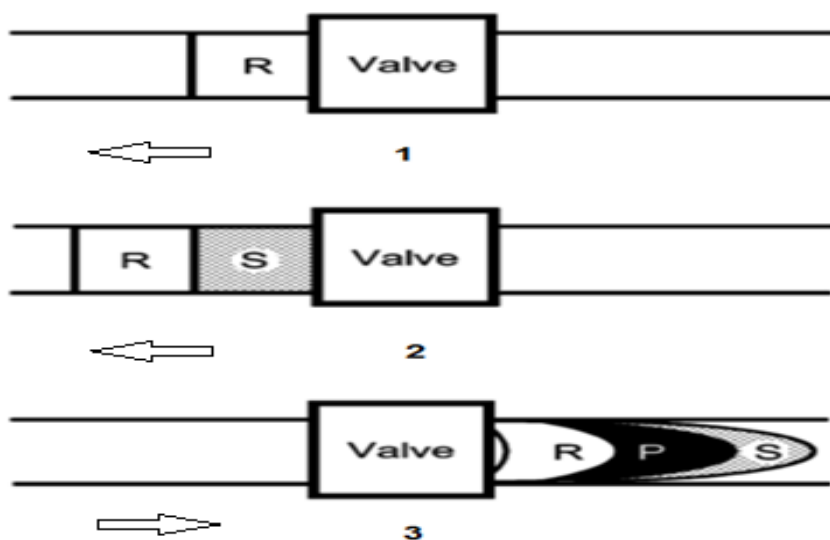
3.1.1 Princip a popis SIA

SIA závisí na principu řízené částečné disperze. Kombinuje přímý a zpětný tok způsobený pístovým čerpadlem přes vícecestný selekční ventil, který umožňuje aspiraci více činidel a vzorků bez nutnosti rekonfigurace zařízení. Tyto činnosti jsou přesně naprogramovány a řízeny počítačem. Do dutiny čerpadla je nejprve aspirováno požadované množství nosného proudu. Poté jsou nasávány činidla a vzorek do mísící cívky. Následným obrácením toku dochází k částečnému promísení zón a dopravení reakční směsi do detektoru [3,4].



Obrázek 1: Schematické znázornění jednoduchého SIA systému

Carrier – nosný proud; pump – pístové čerpadlo; holding coil – mísící cívka; multiposition valve – vícecestný ventil; A,B,C – činidla a vzorky v zásobníku; detector – detektor [3].



Obrázek 2: Schématické znázornění disperze jednotlivých roztoků při měření

R – činidlo; S – vzorek; P – produkt; valve – ventil; 1,2 – nasátí činidla a vzorku; 3 – tvorba zóny produktu po obrácení toku [3].

3.1.2 Uplatnění SIA v praxi

SIA se jeví jako jedna z nadějných alternativ, umožňujících provádět analýzy velkých sérií vzorků (např.: rutinní analýza vod, potravin, krve, moči) s vysokou produktivitou a dostatečnou spolehlivostí a sledovat změny

koncentrace důležitých analytů v průběhu různých procesů. Vyrůstají potřeby na kontrolu kvality životního prostředí, potravin, léčiv, požadavky na rychlost a spolehlivost diagnostických metod v medicíně a biologickém výzkumu, na racionalizaci řízení technologických procesů [2].

Tato metoda byla již mnohokrát využita při analýze složek životního prostředí. Uplatnila se při stanovení některých anorganických iontů (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , SiO_3^{2-}) ve vodě různého původu (povrchové, pitné, odpadní) za účelem kontroly její kvality. Dále byla využita v pracích týkajících se stanovení obsahu herbicidů, které významně ovlivňují kvalitu životního prostředí [2].

Uplatnění našla i v imunoanalytických reakcích. Byly vyvinuty speciální typy detekčních cel, které umožňují imobilizaci protilátek nebo antigenů přímo v SIA systému. Tento způsob byl využit při stanovení imunoglobulinu G, přičemž imobilizace proběhla v reakční cívce [2].

V oblasti farmacie se SIA vztahuje na kontrolu kvality, účinnosti léčiv, hodnocení stability. Pomáhá zjistit obsahovou stejnoměrnost účinné látky v různých léčivých přípravcích a rychlost jejího uvolňování z dané lékové formy [2].

3.2 Chemiluminiscence

Většina molekul látek, které absorbují energii (záření) v ultrafialové nebo viditelné oblasti, ji předávají při kolizích ostatním částicím. Řada analyticky významných sloučenin však takto ztrácí jen část získané energie a zbytek emituje jako tzv. luminiscenční záření.

Podle povahy původně absorbované energie je možno luminiscenční záření molekul rozdělit na fotoluminiscenci (látko absorbovala energii ve formě světelného záření), chemiluminiscenci (energie byla látce dodána chemickou reakcí), bioluminiscence (energie byla dodávána biologickými pochody) a elektroluminiscenci (energie byla dodána působením elektrického pole) [5].

Chemiluminiscence (CL) je proces produkující elektromagnetické (ultrafialové, viditelné, infračervené) záření v důsledku chemické reakce (obvykle oxidace). Jeden nebo více reakčních produktů přechází do excitovaného stavu a emituje záření při přechodu do základního stavu. Díky

absenci excitačního světelného zdroje stačí pro CL stanovení zařízení, které je jednoduché na ovládání, robustní a nákladově efektivní. CL se vyznačuje limitovanou selektivitou, nízkými detekčními limity a širokým lineárním rozsahem kalibrace. CL činidlo poskytuje pozitivní reakci na skupinu podobných sloučenin spíše než na jeden analyt [6].

Mezi faktory ovlivňující CL patří: chemická struktura CL prekursoru, povaha a koncentrace ostatních substrátů podílejících se na CL reakci, výběr katalyzátoru, hydrofobicita rozpouštědla a složek roztoku, přítomnost kovových iontů, pH a iontová síla, teplota [7].

Tato detekční metoda se v současné době uplatňuje v mnoha oborech jako např. farmacie, analytická chemie, medicína, potravinářství a další.

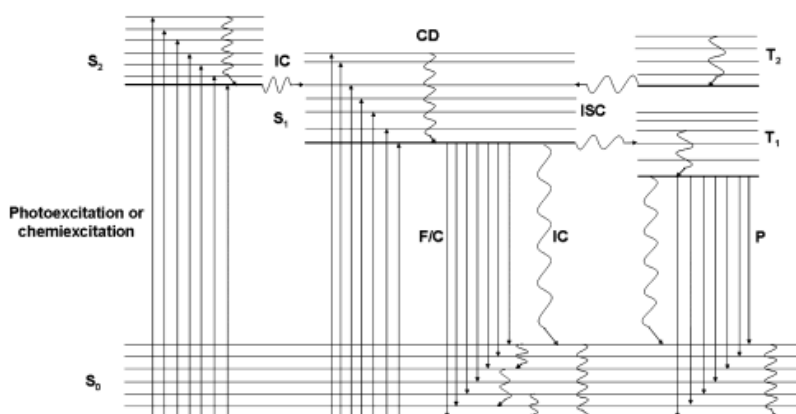
3.2.1 Mechanismus a vznik CL signálu

Má-li dojít k luminiscenci, musí molekula nejprve přejít do excitovaného stavu absorpcí záření vhodné vlnové délky. Absorpcí energie může jeden z párových elektronů molekulového orbitalu (zpravidla jeden z elektronů π orbitalu) přejít do prvního excitovaného singletového stavu S_1 , ve kterém se jeho výsledný spinový moment nezměnil. Takto excitovaná molekula má zpravidla jen velmi krátkou dobu života (10^{-7} až 10^{-8} s). Přijatou energii pak může předat celou jiným částicím např. srážkami (nezářivým přechodem při kolizní deaktivaci).

Jestliže však je stav S_1 relativně stabilní, mohou excitované molekuly přecházet zpět do základního elektronového stavu S_0 složitějším mechanismem. Excitovaná molekula přejde nezářivým přechodem (tzv. vibrační relaxací) na nejnižší, základní vibrační hladinu excitovaného singletového stavu S_1 . Poté může dojít k fluorescenční fotonové emisi v ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra tj. k fluorescenci, kdy se elektrony vracejí do různých vibračních podhladin základního singletového stavu S_0 .

V jiných případech přejdou elektrony tzv. interkombinační konverzí (nezářivý přechod) z nejnižšího vibračního stavu excitovaného singletu S_1 na vyšší vibrační hladinu excitovaného tripletového stavu T_1 , kdy v systému existují dva elektrony se stejným spinem (stav T_1 má obecně menší energii než S_1). Protože molekula bude mít nadbytek vibrační energie, přejde nejprve

deaktivačním nezářivým přechodem do základního vibračního stavu v T1. Tento stav má dlouhou dobu života (řádově 10^{-4} s), neboť přechod do S_0 je spinově zakázaný a proto přechod elektronu z tohoto stavu zpět do základního singletového stavu S_0 (do jeho různých vibračních podhladin) tzv. fosforescenci bude velmi závislý na experimentálních podmínkách. Pokud dojde k přechodu do základního stavu kolizní deaktivací, nebude fosforescence pozorována. Proto chceme-li pozorovat fosforescenci látky, je nutno většinou pracovat za nízké teploty [5].

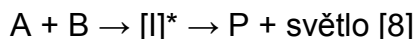


Obrázek 3: Jablonského energetický diagram

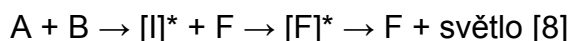
C - chemiluminiscence, F - fluorescence, P - fosforescence; CD - kolizní deaktivace, IC - vnitřní konverze, ISC, mezisystemový přechod, S_0 - základní singletový stav, S_1 , S_2 - excitované singletové stavy, T_1 , T_2 - excitované tropletové stavy, \rightarrow - zářivý přechod (emise fotonů), \rightsquigarrow - nezářivý přechod (bez fotonů) [8]

Chemiluminiscence je emise světla díky chemické reakci. Může probíhat v pevném, kapalném i plynném systému. Podle druhu CL procesu ji můžeme rozdělit na přímé a nepřímé reakční systémy.

U přímého systému je záření emitováno díky přímé reakci dvou reaktantů (A a B), obvykle to bývá CL prekurzor (substrát) a oxidant. Vznikne meziproduct (I) v excitovaném stavu (*), který přechází do základního stavu, a tím se změní v produkt (P) a dochází k emisi fotonů. Jako příklad můžeme uvést přímou oxidaci analytů manganistanem.



Nepřímý systém se vyznačuje tím, že analyt pouze ovlivňuje CL reakci. Analyt je inhibitor nebo katalyzátor CL reakce [9]. Podobně jako u přímé CL spolu reagují dva reaktanty (A a B) a vzniká meziprodukt (I) v excitovaném stavu (*), který předává svou energii luminiscenčnímu akceptoru (F). Ten poté přechází z excitovaného stavu do základního za emise fotonů. Jako příklad můžeme uvést luminolovou nebo peroxyoxalátovou reakci [8]. Analyt může působit jako inhibitor nebo induktor CL reakce, jehož koncentrace může ovlivnit intenzitu nebo množství emitovaného záření [6]. Zde je možno zařadit naši CL reakci, kdy dochází k oxidaci luminolu peroxidem vodíku v bazickém prostředí za katalýzy železitými ionty.



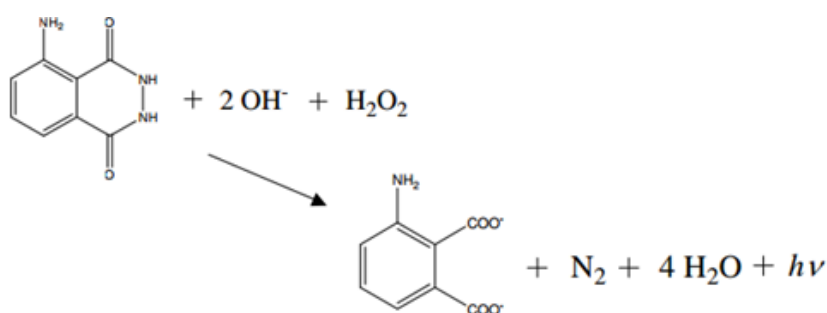
Emise vzniklé pomocí chemické reakce musí splnit základní energetické požadavky:

- Chemiluminiscenční agens musí být schopno přijmout energii z chemické reakce a přejít do excitovaného stavu s dostatečně velkou účinností.
- Reakce musí být exotermická s výměnou volnou energií v rozmezí 170 - 300 kJ·mol⁻¹.
- Na minimu by měly být udržovány deaktivací procesy CL emise, což je molekulární disociace, spontánní izomerizace, fyzikální zhášení, a také kompetitivní nezářivé přechody (intra- a intermolekulární přenos energie) [8].

3.2.2 Luminol jako chemiluminiscenční činidlo

Luminol je odrazovým můstkem v oblasti výzkumu chemiluminiscence - byl objeven roku 1928 a od té doby se datují další objevy v této oblasti. Při oxidaci luminolu peroxidem vodíku v bazickém prostředí a za katalýzy dochází k chemiluminiscenci. Bazické prostředí je zde většinou zajištěno alkalickým karbonátovým pufrům, katalyzátorem reakce jsou zde ionty přechodného kovu (nejčastěji se používají ionty mědnaté nebo železnaté či železité, nejvhodnější pro tuto reakci jsou však ionty kobaltnaté; reakci také

katalyzují i různé přírodní látky např. porfyriny aj. Reakci je možno provést i ve zjednodušeném provedení, kdy se bazické prostředí zajistí přidáním hydroxidu sodného nebo draselného. V tomto provedení však nelze použít jako katalyzátor měďnaté ani železnaté soli, protože by se srážely jejich nerozpustné hydroxidy. Proto v tomto provedení s výhodou používáme jako katalyzátor hexakynoželezitan draselný, případně hexakynoželeznatan draselný. Nevýhodou zjednodušeného provedení je fakt, že hydroxidem vytvořené zásadité prostředí není tak stálé jako prostředí vytvořené pufrům, a proto je délka vyzařování chemiluminiscence v tomto provedení poněkud kratší [10].



Obrázek 4: Schéma CL luminolu [10]

3.3 Stanovení železitých iontů jinými instrumentálními metodami

K dispozici je široká škála možných instrumentálních metod ke stanovení železitých iontů a pro jejich detekci, např. průtoková injekční analýza (FIA), zpětná průtoková injekční analýza (rFIA), voltametrické metody, spektrofotometrie, fluorescence. Dále například iontovýměnná kapalinová chromatografie (HPLC), hmotnostní spektrometrie s indukčně spáženým plazmatem (ICP-MS), atomová absorpční spektrometrie (AAS) [1].

3.3.1 Stanovení železitých iontů pomocí průtokové injekční analýzy spektrofotometrickou detekcí na základě vzniku komplexů s salicylamidem kyseliny o-octové (AcSHA)

FIA je rychlá a přesná metoda, z níž se vydělila metoda SIA. Obě tyto metody našly široké uplatnění při stanovení železa v různých vzorcích [11]. Třemi základními kameny této metody jsou

1. vložení definovaného objemu roztoku do nosného proudu (čínidla a další reagentia byla přidávána dodatečně);
2. reprodukovatelná a přesně načasovaná manipulace vstřikováním vzorku;
3. vytvoření koncentračního gradientu vstřikovaného vzorku poskytují přechodný, ale přesně reprodukovatelný signál [12].

FIA je metoda s plynulým tokem nosného proudu a činidel. Vzorek je vstřikován do tohoto proudu zvlášť. Hlavní rozdíl je v geometrii toku, který je konstantní. Oproti SIA má FIA vyšší spotřebu činidel a vzorku, vícekanálový systém s více ventily a čerpadly, což je nevýhodou [2]. Kromě automatizace ale nabízí FIA další výhody (např. jednoduchá instrumentace, vysoká rychlost analýzy vzorku, snadná automatizace různých analytických postupů a chemických reakcí) [13].

Toto stanovení je založeno na reakci Fe^{3+} iontů s AcSHA v prostředí 2 % roztoku methanolu. Výsledkem je komplex s intenzivním fialovým zbarvením, který silně absorbuje při 475 nm. Za optimalizovaných podmínek byl lineární rozsah v rozmezí 5 – 140 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} s korelačním koeficientem 0,9914 a detekčním limitem 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [11].

3.3.2 Stanovení železitých iontů pomocí zpětné průtokové injekční analýzy spektrofotometrickou detekcí na základě vzniku komplexů s chlortetracyklinem

Speciální metodou FIA je zpětná průtoková analýza (rFIA). Zpětný tok zahrnuje vstřikování detekčního činidla do konstantního toku vzorku. rFIA je jedním z FIA režimů, který slouží ke snížení spotřeby činidla, vzorkovací disperze, ke zlepšení účinnosti míchání a zvýšení citlivosti. Tento jednoduchý

a levný přístup je aplikován i na vícesložkové analýzy sekvenčního vstřikování různých činidel do toku vzorku [13].

Zde můžeme uvést stanovení Fe^{3+} iontů založené na reakci Fe^{3+} ionty s chlortetracyklinem. Vzniká intenzivně zbarvený žlutý komplex s výhodnou absorpcí při vlnové délce 435 nm. Za optimalizovaných podmínek byl lineární rozsah v rozmezí $0,5 - 20,0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} s korelačním koeficientem 0,997 a detekčním limitem $0,10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [14].

3.3.3 Stanovení železitých iontů pomocí poklesu fluorescence

Mezi další metody vyvinuté ke stanovení železitých iontů ve vodě můžeme uvést metodu, která byla vyvinuta za použití derivátu rhodaminu B, rhodamin amidu (RHA), v kyselém acetátovém pufru (HAc-NaAC). V tomto přístupu je využit těžký atom I_3^- , který je schopen zhášet fluorescenci RHA. K vytvoření nefluorescenční sloučeniny dochází když Fe^{3+} reaguje s přebytkem KI a vzniká I_3^- , které je schopno zhášet fluorescenci RHA. Výsledky ukázaly, že intenzita poklesu fluorescence RHA představovala dobrou lineární závislost na obsahu Fe^{3+} v rozmezí koncentrací $0,5 - 5\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s korelačním koeficientem 0,9970, a detekčním limitem $0,3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$. Tento přístup byl použit pro stanovení Fe^{3+} ve vzorcích vody, a výtěžnost byla zjištěna v rozmezí 80,7% až 100,8%. Tato metoda vykazuje vysokou citlivost a dobrou selektivitu vůči železitým iontům [15].

3.3.4 Stanovení železitých iontů pomocí zlaté elektrody modifikované samoorganizačními monovrstvami (SAM) kyseliny 2-sulfojantarové (MSA)

Železité ionty byly citlivě a selektivně stanoveny při nízkých koncentracích v přítomnosti železnatých iontů za použití zlato – 2-sulfojantarové kyseliny jednovrstevné elektrody pomocí adsorpční rozpouštěcí voltametrie obdélníkovou vlnou. Tento vytvořený snímač je výhodný jednoduchou výrobou, nízkými detekčními limity (10^{-9} až $10^{-12} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a širokým lineárním dynamickým rozsahem. Nemá nedostatky, které souvisí se rtuťovou elektrodou. Použitelnost elektrody pro stanovení železitých iontů v reálných vzorcích byl úspěšně testován ve farmaceutickém materiálu stejně jako u vzorků vody s menším

rušením maticí vzorku. Chemická modifikace povrchu elektrod je hlavní oblastí současného výzkumu v elektrochemii. Měrný systém byl složen z pracovní Au-MSA elektrody, z referenční Ag/AgCl elektrody a platinové fólie s velkou plochou jako pomocné elektrody.

Rozpouštěcí voltametrie je metoda, která umožňuje přímé elektrochemické stanovení stopových množství železa v reálných vzorcích. Skládá se z prekoncentračního kroku (nahromadění stanovované látky na elektrodu) a rozpouštěcího „stripping“ kroku, kdy se sleduje elektrochemické chování nahromaděné látky [16].

4 Experimentální část

4.1 Laboratorní přístroje

- Analytické váhy SARTORIUS 2004 MP, Německo
- Ultrazvuková lázeň SONOREX RK 100, Bandelin electronic, Německo

SIA systém:

- Počítač se speciálními kartami AT-MIO-16E10 a AT-23214 a programovacím prostředím LabVIEW (National Instruments Corporation, USA)
- Ovládací program FAFSIA vytvořený na Katedře analytické chemie, verze FafSia 1.0

SIA systém s detektorem

- Pístové čerpadlo Cavro XL 3000 s objemem 2,5 ml (Cavro Scientific Instruments Inc. USA)
- Deseticestný selekční ventil VICI VALCO (Valco Instruments Co. Inc., USA)
- Mísící cívka o objemu 1,2 ml z teflonové (PTFE) hadičky o průměru 0,75 mm
- Fluorimetrický průtokový detektor model FS 970 (Schoeffel Instruments Inc. USA)
- Spojovací materiál – hadička z teflonu (PTFE) o vnitřním průměru 0,50 a 0,75 mm (Watrex, Česká republika)

4.2 Použité chemikálie

- Hexakynoželezitan draselný 99%, Balex, Pardubice, ČR
- Peroxid vodíku 30%, Sigma-Aldrich, Německo
- Luminol 98%, Fluka BioChemika, Německo
- Hydroxid sodný, min. 98%, Penta Chrudim, ČR
- Hexakynoželeznatan draselný 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Dusičnan železitý nonahydrát 98%, Lachema, Praha, ČR
- Chlorid železitý hexahydrát 99%, Balex, Pardubice, ČR

4.3 SIA systém s detektorem

4.3.1 SIA systém

Nejprve byla naprogramována dvojcestná pístová pumpa, která sloužila jako čerpadlo. Při prvním měření každého dne byla pumpa vynulována (initialize) a promyty všechny porty. Polohou IN bylo umožněno nasávání nosného proudu (destilovaná voda) do dutiny pístového čerpadla a byla zvolena jeho rychlost a objem. Pak byla pumpa přepnuta do polohy OUT a tím došlo ke spojení s mísící cívkou. Do této cívky byly zadanými porty selekčního ventilu aspirovány roztoky činidel a vzorku. Poté došlo k obrácení toku a objem mísící cívky a dutiny čerpadla byl stanovenou rychlostí poslán do detektoru, který začal snímat intenzitu CL. Ukázky vytvořených programů, které byly použity, jsou zobrazeny na obrázku 5,6.

Tento systém obsahoval 10-cestný selekční ventil. Porty na tomto ventilu byly označeny od 1 do 10 a využity byly porty: 2 – peroxid vodíku, 3 - luminol, 4 – hexakynoželezitan draselný, 9 - detektor. Ostatní porty nebyly zapojeny. Princip a popis tohoto systému byl popsán v experimentální části v kapitole 2.1.

Syringe pump	valve position IN		(pumpa pozice IN)
Syringe pump	set flow rate [ul/s]	100	(rychlost aspirace)
Syringe pump	aspirate [ul]	500	(aspirovaný objem)
Syringe pump	valve position OUT		(pumpa pozice OUT)
Syringe pump	set flow rate [ul/s]	100	
multi-port valve	set valve position	2	(peroxid vodíku)
Syringe pump	aspirate [ul]	50	
multi-port valve	set valve position	4	(hexakynoželezitan draselný)
Syringe pump	aspirate [ul]	50	
multi-port valve	set valve position	3	(luminol)
Syringe pump	aspirate [ul]	50	
multi-port valve	set valve position	9	(detektor)
Syringe pump	set flow rate [ul/s]	100	(rychlost průtoku detektorem)
Syringe pump	empty syringe		(vyprázdnit pumpu)
*Number of cycles #3			(opakovat 3 krát)

Obrázek 5: Měřicí cyklus

Syringe pump	valve position IN		(pumpa pozice IN)
Syringe pump	set flow rate [ul/s]	100	(rychlost aspirace)
Syringe pump	aspirate [ul]	500	(aspirovaný objem)
Syringe pump	valve position OUT		(pumpa pozice OUT)
Syringe pump	set flow rate [ul/s]	100	
multi-port valve	set valve position	2	(peroxid vodíku)
Syringe pump	aspirate [ul]	50	
multi-port valve	set valve position	4	(hexakynoželezitan draselný)
Syringe pump	aspirate [ul]	50	
multi-port valve	set valve position	3	(luminol)
Syringe pump	aspirate [ul]	50	
multi-port valve	set valve position	6	(nosný proud)
Syringe pump	aspirate [ul]	100	
multi-port valve	set valve position	9	(detektor)
Syringe pump	dispense [ul]	70	(vypustit objem do detektoru)
Syringe pump	aspirate [ul]	70	(aspirovat objem z detektoru)
Syringe pump	set flow rate [ul/s]	120	(rychlost průtoku detektorem)
Syringe pump	empty syringe		(vyprázdnit pumpu)
*Number of cycles #3			(opakovat 3 krát)

Obrázek 6: Promísení

4.3.2 Detekce a hodnocení signálu

Pro CL stanovení byl upraven fluorimetrický průtokový detektor model FS 970. Lampa fluorimetru byla vypnutá (primární záření). V místě sekundárního filtru byl vložen spirální CL modul z plexiskla, který kopíroval tvar sekundárního filtru. Součástí tohoto modulu byla pětkrát stočená spirála tvořená z teflonové průhledné hadičky o vnitřním průměru 0,50 mm. Měřený produkt byl přiváděn do středu spirály a odváděn do vnější části spirály a poté až do odpadu [17]. Celý detektor byl uzavřen v nepropustném černém obalu, aby nebylo ovlivněno CL záření.

Grafický záznam byl vyhodnocen pomocí ovládacího program FAFSIA vytvořeného na Katedře analytické chemie. Z grafického záznamu byla odečtena výška píku. Při měření bylo třeba měnit rozsah stupnice (citlivost měření). Použitím vzorce byla vypočítána intenzita CL. Intenzita CL je přímo úměrná výšce píku.

$$\text{Výpočet: (rozsah } [\mu\text{A}] \cdot 1000 \cdot \text{Ø výšky píku)} / 2,5 = \text{intenzita CL [nA]}$$

4.4 Příprava roztoků

Roztoky byly připravovány v odměrných baňkách o potřebných objemech a všechny roztoky (kromě roztoku peroxidu vodíku) byly ponořeny na 5 minut do ultrazvukové lázně. Roztoky byly uchovávány v lednici. Před měřením byly vytaženy, aby získaly pokojovou teplotu, při které bylo prováděno měření.

Roztok peroxidu vodíku byl připravován před každým měřením znovu kvůli své nestabilitě.

4.4.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok hydroxidu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven pomocí navážky 0,4 g rozpuštěné ve 100 ml destilované vody.

4.4.2 Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztok peroxidu vodíku o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven odpipetováním 560 μl 30% peroxidu vodíku do odměrné baňky na 50 ml a doplněn po rysku destilovanou vodou. Po promíchání byl z tohoto roztoku odebrán 1 ml do odměrné baňky na 100 ml a doplněn destilovanou vodou.

Pracovní roztok luminolu o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven pomocí navážky 0,0177 g rozpuštěné v hydroxidu sodném o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v odměrné baňce na 100 ml.

Zásobní roztok chloridu železitého hexahydrátu o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven pomocí navážky 0,0269 g rozpuštěné v destilované vody v odměrné baňce o objemu 100 ml. Z něhož byl postupným ředěním připraven pracovní roztok o koncentraci $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Zásobní roztok dusičnanu železitého nonahydrátu o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven pomocí navážky 0,0402 g rozpuštěné v destilované vody v odměrné baňce o objemu 100 ml. Z něhož byl postupným ředěním připraven pracovní roztok o koncentraci $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Zásobní roztok hexakynoželezitanu draselného o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven pomocí navážky 0,0328 g rozpuštěné v destilované vody v odměrné baňce na 100 ml. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada roztoků.

Tabulka 1 : Příprava roztoků hexakynoželezitanu draselného.

Zásobní roztok [mol·l ⁻¹]	Odebraný objem [ml]	Výsledný objem [ml]	Pracovní roztok [mol·l ⁻¹]
1·10 ⁻³	10,00	100	1·10 ⁻⁴
1·10 ⁻⁴	10,00	100	1·10 ⁻⁵
1·10 ⁻⁵	10,00	100	1·10 ⁻⁶
1·10 ⁻⁶	10,00	100	1·10 ⁻⁷
1·10 ⁻⁷	8,00	10	8·10 ⁻⁸
1·10 ⁻⁷	6,00	10	6·10 ⁻⁸
1·10 ⁻⁷	4,00	10	4·10 ⁻⁸
1·10 ⁻⁷	2,00	10	2·10 ⁻⁸
1·10 ⁻⁷	10,00	100	1·10 ⁻⁸
1·10 ⁻⁸	6,00	10	6·10 ⁻⁹
1·10 ⁻⁸	4,00	10	4·10 ⁻⁹
1·10 ⁻⁸	2,00	10	2·10 ⁻⁹
1·10 ⁻⁸	10,00	100	1·10 ⁻⁹
1·10 ⁻⁹	8,00	10	8·10 ⁻¹⁰

4.5 Optimalizace parametrů

Pro nalezení vhodných podmínek stanovení železitých iontů pomocí SIA bylo nutné optimalizovat parametry metody a tím zajistit co nejlepší odezvy detektoru a opakovatelnost výsledků. Základem stanovení železitých iontů bylo jejich katalytické působení na intenzitu CL při oxidaci luminolu peroxidem vodíku v alkalickém prostředí.

Optimalizované parametry:

- sekvence
- rychlost mísení
- rychlost průtoku detektorem
- koncentrace železitých iontů
- pracovní napětí detektoru
- objemy činidel
- promísení

4.5.1 Vliv aspirace roztoků na intenzitu CL

Bylo potřeba zjistit nejvhodnější sekvenci aspirace činidel a vzorku tak, aby odezva detektoru byla co nejvyšší. Jako základ byla vzata činidla a vzorek o koncentraci 10⁻³ mol·l⁻¹ a objemu 50 μl. Byly vyzkoušeny všechny varianty aspirace roztoku (Kap. 5.1.1). Výsledná nejvhodnější sekvence byla používána

v dalších měřeních. Musíme si uvědomit také to, že dochází k aspiraci činidel a vzorku do mísící cívky, takže pořadí průchodu detektorem je opačné.

4.5.2 Vliv rychlosti mísení a průtoku detektorem na intenzitu CL

Byly testovány neoptimálnější hodnoty mísící rychlosti. Rozmezí testovaného parametru bylo $30 - 150 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dále byly testovány rychlosti průtoku detektorem v rozmezí $30 - 60 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. Poté byla ještě testována vyšší rychlost v rozmezí $30 - 90 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$.

Optimální rychlosti byly ty s nejlepší odezvou detektoru, tedy s nejvyšší intenzitou CL, která je zajištěna dostatečným promísením, ale také rychlým transportem produktu do detektoru.

4.5.3 Vliv koncentrace železitých iontů na intenzitu CL

Byla zkoumána katalytická účinnost železitých iontů v různých koncentracích. Zde byl pozorován vztah mezi koncentrací železitých iontů a intenzitou CL. Byly měřeny sekvence s různými koncentracemi železitých iontů a velikost šumu ve slepém vzorku.

4.5.4 Vliv změny napětí na intenzitu chemiluminiscence

Cílem bylo optimalizovat pracovní napětí detektoru se snahou o co největší rozlišení měřených koncentrací železitých iontů (10^{-8} , $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) od slepého vzorku. Vždy byla proměřována jedna koncentrace a bylo postupně po 10 V zvyšováno napětí a výsledky byly zaznamenány do tabulek.

4.5.5 Vliv objemu činidel na intenzitu CL

Byly hledány nejvhodnější objemy aspirace činidel a vzorku, při kterých by odezva detektoru byla nejvyšší.

4.5.6 Vliv promísení na intenzitu CL

Byla snaha zvýšit promísení několikanásobnou změnou směru toku nosného proudu a tím celé detekované směsi. Program pro promísení je uveden na obrázku 6. Podle stanovené sekvence byly nasávány činidla a vzorek. V tomto měření bylo ještě aspirováno $100 \mu\text{l}$ nosného proudu z portu 6, aby se reagující směs posunula dále do mísící cívky. Poté bylo puštěno $70 \mu\text{l}$ objemu nosného proudu z pumpy do detektoru a následně vráceno stejné

množství zpět a pak došlo k úplnému vypuštění celého objemu pumpy do detektoru a změření intenzity CL.

4.6 Kalibrační závislost

Byla proměřena za standardizovaných podmínek uvedených v tabulce 35. Byl zjištěn typ kalibrační závislosti, kvantifikační a detekční limity.

4.7 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla proměřena u koncentrací Fe^{3+} iontů: $2 \cdot 10^{-9}$ a $4 \cdot 10^{-9}$ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ za podmínek uvedených v tabulce 35 Tabulka 35 při napětí 350 V. Měření bylo provedeno 10 krát. Byl zjištěn průměr výšky píku, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

4.8 Porovnání intenzity CL u různých železitých sloučenin

Jako standard pro měření koncentrace Fe^{3+} iontů byla použita sloučenina hexakyanoželezitan draselný. Dále byly použity sloučeniny dusičnanu železitého a chloridu železitého. Všechny tyto sloučeniny byly porovnávány se slepým vzorkem a proměřeny za stejných podmínek uvedených v tabulce 39. Koncentrace Fe^{3+} iontů byla u všech sloučenin $4 \cdot 10^{-9}$ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Bylo sledováno, jaký vliv mají různé anionty v Fe^{3+} sloučeninách na intenzitu CL a jaký dopad může mít rychlost průtoku detektorem na rychlost katalýzy CL reakce.

4.9 Vliv železnatých iontů na intenzitu CL při stanovení železitých iontů

Byly měřeny roztoky hexakyanoželezitanu a hexakyanoželeznatanu draselného o koncentraci $4 \cdot 10^{-9}$ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při 350 V za podmínek uvedených v tabulce 42. Nejprve byl každý roztok změřen zvlášť a pak byly smíchány dohromady v poměru 1:1 a byl sledován vliv na intenzitu CL.

5 Výsledky měření a diskuse

5.1 Optimalizace parametrů

Optimalizace měla za cíl nalezení vhodných podmínek pro stanovení železitých iontů sekvenční injekční analýzou pomocí chemiluminiscenční detekce.

5.1.1 Vliv aspirace roztoků na intenzitu chemiluminiscence

Tabulka 2: Parametry měření vlivu aspirace roztoků na intenzitu CL

Port 2	50 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Port 3	50 μl luminol $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Port 4	50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Napětí	190 V
Rychlost mísení	30 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$
Rychlost průtoku detektorem	30 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$
Rozsah	0,2 μA

Každé měření bylo prováděno třikrát a průměrná hodnota byla zaznamenána do tabulky.

Tabulka 3: Výsledky měření vlivu aspirace roztoků na intenzitu CL

	Aspirace vzorku	Měření \bar{x}	Intenzita CL \bar{x} [nA]	SD[nA]	RSD [%]
1.	234	1,222	97,723	2,895	2,96
2.	243	1,407	112,559	1,981	1,76
3.	324	0,462	36,929	0,570	1,54
4.	342	0,675	54,007	0,433	0,80
5.	423	0,727	58,134	1,224	2,11
6.	432	0,917	73,373	0,903	1,23

Nejvýhodnější sekvence byla nalezena při nejvyšší naměřené hodnotě intenzity CL, což byla hodnota odpovídající aspiraci roztoků v pořadí 243. S touto sekvencí aspirace bylo dále pracováno.

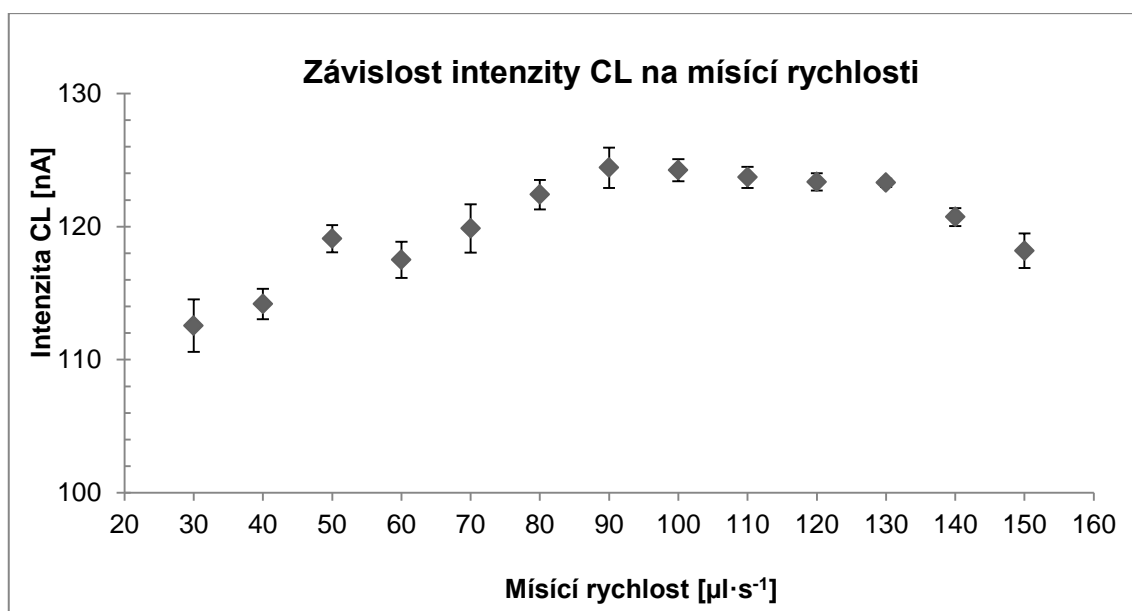
5.1.2 Vliv rychlosti mísení a průtoku detektorem na intenzitu chemiluminiscence

Tabulka 4: Parametry měření vlivu rychlosti mísení a průtoku detektorem na intenzitu CL

Port 2	50 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Port 3	50 μl luminol $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Port 4	50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Pořadí aspirace roztoků	243
Napětí	190 V
Rozsah	0,2 μA

Tabulka 5: Výsledky měření rychlosti mísení při průtoku detektorem $30 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$

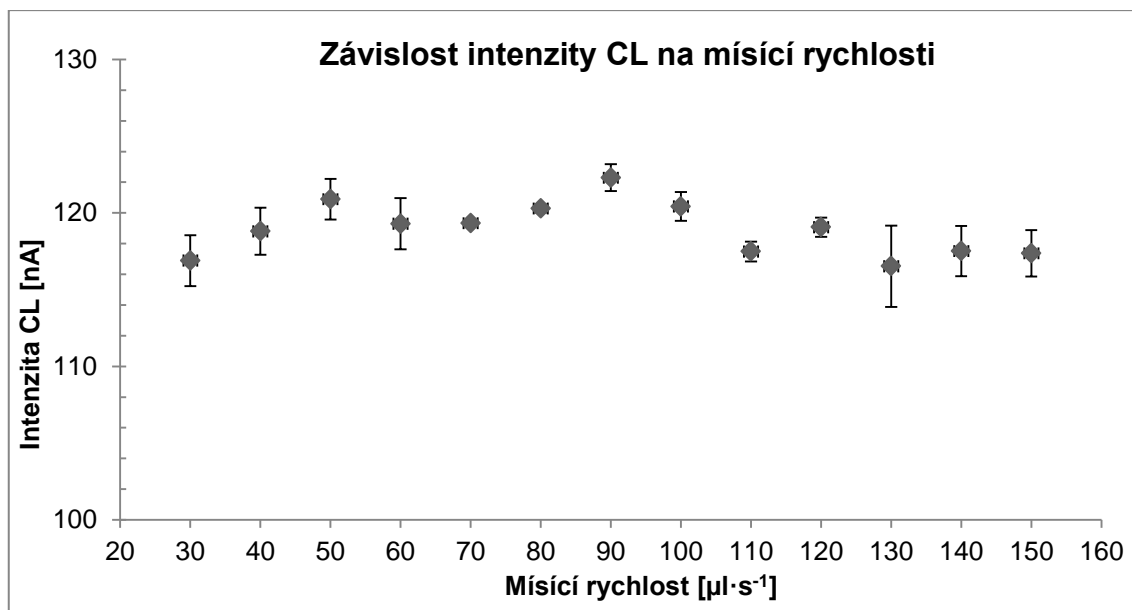
	Rychlost mísení [$\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$]	Měření	Ø	Intenzita CL [nA]	Ø [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	30	1,372	1,407	109,766	112,559	1,981	1,76
2.		1,422		113,777			
3.		1,427		114,134			
1.	40	1,412	1,427	112,960	114,187	1,143	1,00
2.		1,424		113,890			
3.		1,446		115,711			
1.	50	1,472	1,489	117,788	119,081	1,022	0,86
2.		1,490		119,166			
3.		1,504		120,288			
1.	60	1,445	1,469	115,619	117,503	1,349	1,15
2.		1,484		118,707			
3.		1,477		118,184			
1.	70	1,468	1,468	117,446	119,867	1,810	1,51
2.		1,504		120,356			
3.		1,522		121,798			
1.	80	1,514	1,530	121,129	122,400	1,117	0,91
2.		1,522		121,797			
3.		1,547		123,762			
1.	90	1,529	1,555	122,344	124,427	1,512	1,22
2.		1,574		125,887			
3.		1,563		125,049			
1.	100	1,543	1,553	123,454	124,236	0,834	0,67
2.		1,548		123,862			
3.		1,567		125,392			
1.	110	1,534	1,546	122,754	123,699	0,803	0,65
2.		1,545		123,626			
3.		1,559		124,718			
1.	120	1,532	1,542	122,594	123,357	0,656	0,53
2.		1,552		124,197			
3.		1,541		123,281			
1.	130	1,544	1,541	123,534	123,299	0,310	0,25
2.		1,544		123,502			
3.		1,536		122,860			
1.	140	1,519	1,509	121,505	120,716	0,675	0,56
2.		1,498		119,857			
3.		1,510		120,787			
1.	150	1,456	1,477	116,455	118,185	1,299	1,10
2.		1,481		118,513			
3.		1,495		119,586			



Obrázek 7: Grafické zpracování výsledků měření rychlosti mísení při průtoku detektorem $30 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$

Tabulka 6: Výsledky měření rychlosti mísení při průtoku detektorem $40 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$

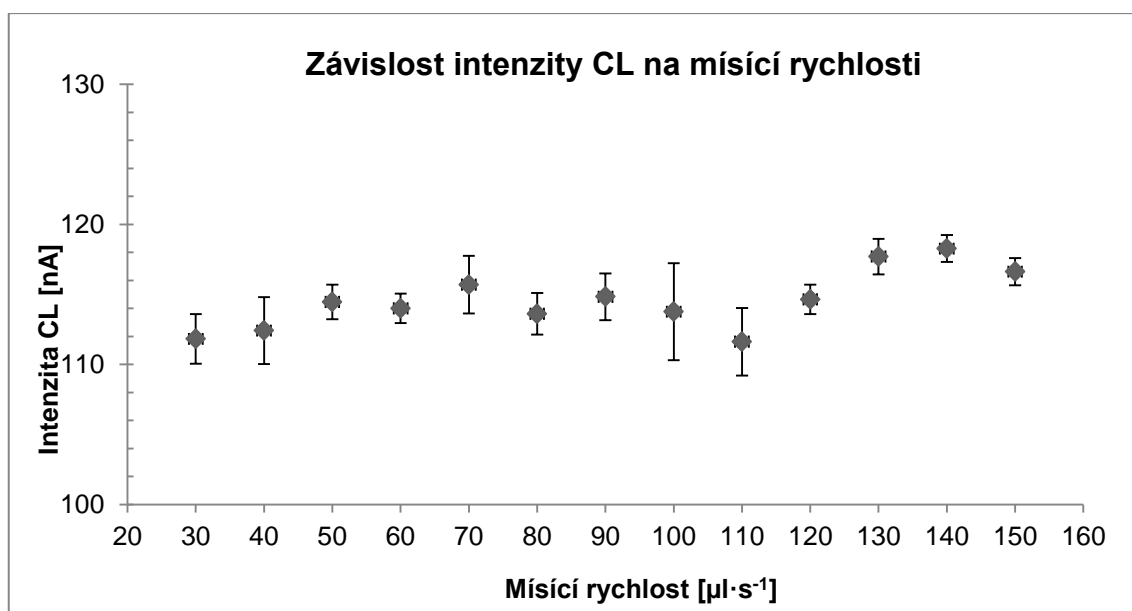
	Rychlost mísení [$\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$]	Měření	Ø	Intenzita CL [nA]	Ø [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	30	1,447	1,461	115,722	116,895	1,658	1,42
2.		1,447		115,722			
3.		1,491		119,240			
1.	40	1,468	1,485	117,423	118,801	1,533	1,29
2.		1,476		118,040			
3.		1,512		120,940			
1.	50	1,488	1,511	119,033	120,893	1,329	1,10
2.		1,520		121,587			
3.		1,526		122,058			
1.	60	1,465	1,491	117,202	119,296	1,660	1,39
2.		1,493		119,421			
3.		1,516		121,264			
1.	70	1,490	1,492	119,163	119,334	0,121	0,10
2.		1,493		119,422			
3.		1,493		119,417			
1.	80	1,506	1,504	120,478	120,284	0,265	0,22
2.		1,506		120,466			
3.		1,499		119,909			
1.	90	1,514	1,529	121,151	122,295	0,873	0,71
2.		1,531		122,466			
3.		1,541		123,269			
1.	100	1,489	1,505	119,145	120,423	0,942	0,78
2.		1,509		120,738			
3.		1,517		121,386			
1.	110	1,459	1,469	116,682	117,484	0,655	0,56
2.		1,469		117,482			
3.		1,479		118,288			
1.	120	1,479	1,488	118,287	119,073	0,622	0,52
2.		1,498		119,808			
3.		1,489		119,125			
1.	130	1,413	1,457	113,035	116,523	2,651	2,27
2.		1,463		117,079			
3.		1,493		119,456			
1.	140	1,447	1,469	115,794	117,516	1,638	1,39
2.		1,463		117,034			
3.		1,496		119,719			
1.	150	1,440	1,467	115,228	117,371	1,517	1,29
2.		1,479		118,342			
3.		1,482		118,542			



Obrázek 8: Grafické zpracování výsledků měření rychlosti mísení při průtoku detektorem $40 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$

Tabulka 7: Výsledky měření rychlosti mísení při průtoku detektorem $50 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$

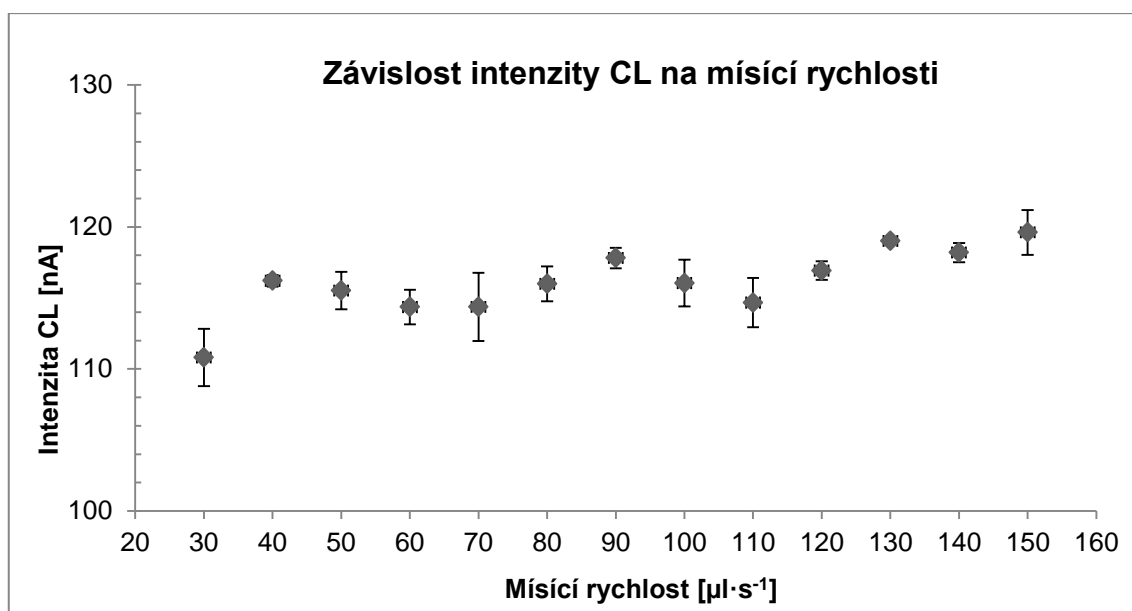
	Rychlost mísení [$\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$]	Měření	\emptyset	Intenzita CL [nA]	\emptyset [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	30	1,370	1,398	109,590	111,822	1,772	1,59
2.		1,399		111,950			
3.		1,424		113,926			
1.	40	1,366	1,405	109,242	112,411	2,389	2,13
2.		1,412		112,985			
3.		1,438		115,008			
1.	50	1,410	1,431	112,815	114,458	1,227	1,07
2.		1,435		114,794			
3.		1,447		115,764			
1.	60	1,409	1,425	112,738	113,999	1,052	0,92
2.		1,424		113,944			
3.		1,441		115,314			
1.	70	1,416	1,446	113,242	115,691	2,065	1,78
2.		1,444		115,538			
3.		1,479		118,294			
1.	80	1,403	1,420	112,216	113,609	1,482	1,30
2.		1,412		112,950			
3.		1,446		115,662			
1.	90	1,407	1,435	112,592	114,827	1,665	1,45
2.		1,441		115,301			
3.		1,457		116,588			
1.	100	1,361	1,422	108,913	113,762	3,460	3,04
2.		1,445		115,614			
3.		1,459		116,758			
1.	110	1,353	1,395	108,234	111,621	2,407	2,16
2.		1,420		113,611			
3.		1,413		113,017			
1.	120	1,418	1,433	113,439	114,638	1,055	0,92
2.		1,431		114,468			
3.		1,450		116,006			
1.	130	1,452	1,471	116,197	117,701	1,270	1,08
2.		1,470		117,602			
3.		1,491		119,304			
1.	140	1,462	1,478	116,991	118,268	0,961	0,81
2.		1,481		118,502			
3.		1,491		119,310			
1.	150	1,442	1,458	115,322	116,618	0,980	0,84
2.		1,460		116,838			
3.		1,471		117,694			



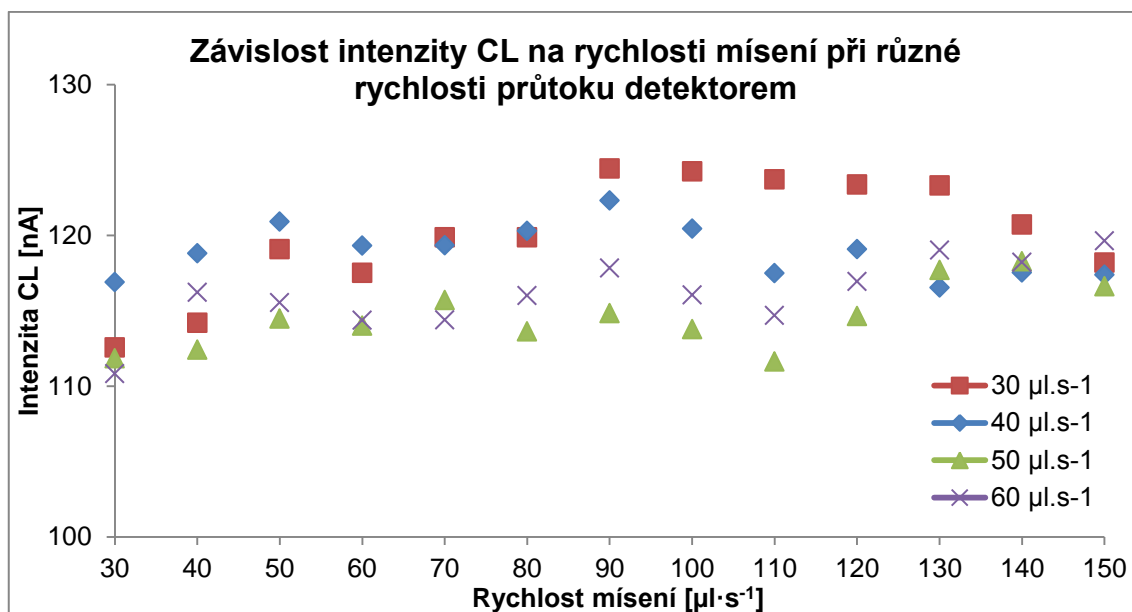
Obrázek 9: Grafické zpracování výsledků měření rychlosti mísení při průtoku detektorem $50 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$

Tabulka 8: Výsledky měření rychlosti mísení při průtoku detektorem $60 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$

	Rychlost mísení [$\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$]	Měření	\emptyset	Intenzita CL [nA]	\emptyset [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	30	1,359	1,385	108,727	110,804	2,019	1,82
2.		1,377		110,145			
3.		1,419		113,539			
1.	40	1,450	1,453	116,008	116,209	0,414	0,36
2.		1,448		115,832			
3.		1,460		116,786			
1.	50	1,430	1,444	114,362	115,520	1,321	1,14
2.		1,435		114,830			
3.		1,467		117,368			
1.	60	1,412	1,429	112,990	114,359	1,220	1,07
2.		1,427		114,137			
3.		1,449		115,952			
1.	70	1,387	1,430	110,988	114,371	2,410	2,11
2.		1,446		115,707			
3.		1,455		116,418			
1.	80	1,429	1,450	114,307	115,993	1,233	1,06
2.		1,465		117,223			
3.		1,456		116,449			
1.	90	1,467	1,473	117,370	117,815	0,722	0,61
2.		1,485		118,834			
3.		1,466		117,241			
1.	100	1,427	1,451	114,161	116,046	1,639	1,41
2.		1,448		115,819			
3.		1,477		118,157			
1.	110	1,405	1,433	112,377	114,673	1,741	1,52
2.		1,438		115,051			
3.		1,457		116,592			
1.	120	1,458	1,462	116,654	116,927	0,646	0,55
2.		1,454		116,309			
3.		1,473		117,819			
1.	130	1,485	1,488	118,807	119,017	0,223	0,19
2.		1,486		118,918			
3.		1,492		119,325			
1.	140	1,470	1,477	117,592	118,199	0,677	0,57
2.		1,473		117,862			
3.		1,489		119,143			
1.	150	1,481	1,495	118,454	119,619	1,577	1,32
2.		1,482		118,553			
3.		1,523		121,849			



Obrázek 10: Grafické zpracování výsledků měření rychlosti mísení při průtoku detektorem $60 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$



Obrázek 11: Porovnání všech rychlostí průtoku detektorem

Nejvyšší intenzita CL odpovídala měření při rychlosti průtoku detektorem $30 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ a při rychlosti mísení $90 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. Pro další měření byla použita hodnota rychlosti mísení $100 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ z důvodu nižší směrodatné odchylky a přitom srovnatelného CL signálu. Nejvyšší hodnoty CL byly získány při rychlosti průchodu detektorem $30 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$, což odpovídá delší reakční době (trvá déle, než se reagující zóna dostane do detekční cely). V této závislosti je viditelný nárůst

CL od rychlosti mísení 30 do 90 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$, pak do rychlosti 130 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ signál zůstává na stejné úrovni a při použití vyšších rychlostí začíná klesat.

5.1.3 Vliv koncentrace železitých iontů na intenzitu chemiluminiscence

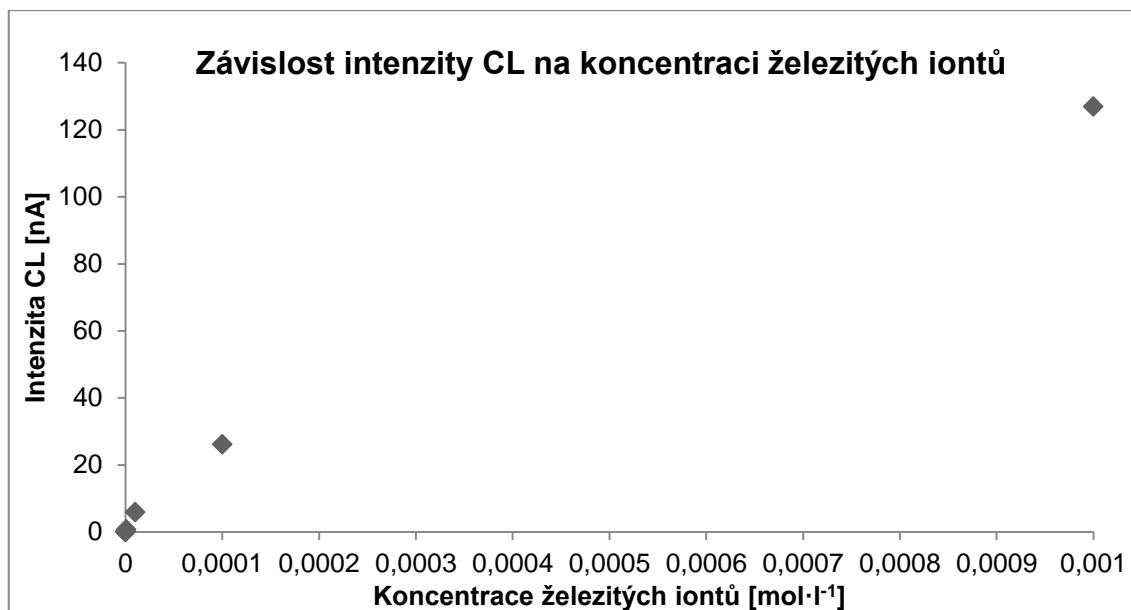
Tabulka 9: Parametry měření vlivu koncentrace železitých iontů na intenzitu CL

Port 2	50 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Port 3	50 μl luminol $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Port 4	50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ různé koncentrace
Pořadí aspirace roztoků	243
2V3	Slepý vzorek (místo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ nosný proud)
Napětí	190 V
Rychlost mísení	100 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$
Rychlost průtoku detektorem	30 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$

Tabulka 10: Výsledky měření vlivu koncentrace železitých iontů na intenzitu CL

	Koncentrace [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření	$\bar{\sigma}$	Intenzita CL [nA]	$\bar{\sigma}$ [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	Slepý	0,01	0,027*	0,020	0,108	0,079	-	-
2.			0,020*		0,080			
3.			0,012*		0,048			
1.	$1\cdot 10^{-8}$	0,01	0,001*	0,001	0,004	0,004	-	-
2.			0,001*		0,004			
3.			0,001*		0,004			
1.	$1\cdot 10^{-7}$	0,01	0,022*	0,021	0,088	0,084	-	-
2.			0,022*		0,088			
3.			0,019*		0,076			
1.	$1\cdot 10^{-6}$	0,01	0,208	0,193	0,831	0,770	-	-
2.			0,190*		0,760			
3.			0,180*		0,720			
1.	$1\cdot 10^{-5}$	0,01	1,453	1,467	5,813	5,867	0,074	1,26
2.			1,454		5,816			
3.			1,493		5,972			
1.	$1\cdot 10^{-4}$	0,05	1,268	1,306	25,355	26,112	0,668	2,56
2.			1,300		26,002			
3.			1,349		26,979			
1.	$1\cdot 10^{-3}$	0,2	1,566	1,586	125,315	126,868	1,156	0,91
2.			1,601		128,087			
3.			1,590		127,201			

* Naměřené hodnoty byly odečteny z programu ručně kvůli příliš nízké intenzitě CL.



Obrázek 12: Grafické zpracování výsledků měření vlivu koncentrace železitých iontů na intenzitu CL

Bylo zjištěno, že intenzita CL se zvyšuje se zvyšující koncentrací železitých iontů v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, u nižších koncentrací už pak zůstává téměř stejná, srovnatelná se slepým vzorkem.

5.1.4 Vliv změny napětí na intenzitu chemiluminiscence při různých koncentracích železitých iontů

Tabulka 11: Parametry měření vlivu napětí na intenzitu CL při různých koncentracích železitých iontů

Port 2	50 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Port 3	50 μl luminol $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Port 4	50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ různé koncentrace
Pořadí aspirace roztoků	243
Rychlost mísení	$100 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$
Rychlost průtoku detektorem	$30 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$

Tabulka 12: Výsledky měření vlivu změny napětí na intenzitu CL slepého vzorku

Napětí [V]	Rozsah [μ A]	Měření \bar{O}	Intenzita CL \bar{O} [nA]	SD [nA]	RSD [%]
300	0,1	0,14*	5,6	-	-
310	0,1	0,19*	7,6	-	-
320	0,1	0,257	10,293	0,040	0,38
330	0,1	0,351	14,031	0,335	2,39
340	0,1	0,481	19,256	0,069	0,36
350	0,2	0,337	26,969	1,465	5,43
360	0,2	0,450	35,973	0,465	1,29
370	0,5	0,234	46,773	3,059	6,54
380	0,2	0,823	65,874	1,436	2,18
390	0,2	1,047	83,773	1,815	2,17
400	0,2	1,490	119,201	1,498	1,26

* Naměřené hodnoty byly odečteny z programu ručně kvůli příliš nízké intenzitě CL.

Tabulka 13: Výsledky měření vlivu změny napětí na intenzitu CL při koncentraci železitých iontů $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Napětí [V]	Rozsah [μ A]	Měření \bar{O}	Intenzita CL \bar{O} [nA]	SD [nA]	RSD [%]
300	0,1	0,555	22,206	0,408	1,84
310	0,1	0,714	28,551	0,960	3,36
320	0,1	1,060	42,399	0,176	0,41
330	0,1	1,421	56,833	0,369	0,65
340	0,1	1,943	77,716	1,683	2,17
350	0,2	1,333	106,621	3,066	2,88
360	0,2	1,747	139,767	0,382	0,27
370	0,5	0,947	189,301	6,931	3,66
380	0,5	1,168	233,551	1,501	0,64
390	0,5	1,492	298,433	5,637	1,89
400	0,5	1,931	386,133	8,140	2,11

Tabulka 14: Výsledky měření vlivu změny napětí na intenzitu CL při koncentraci železitých iontů $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

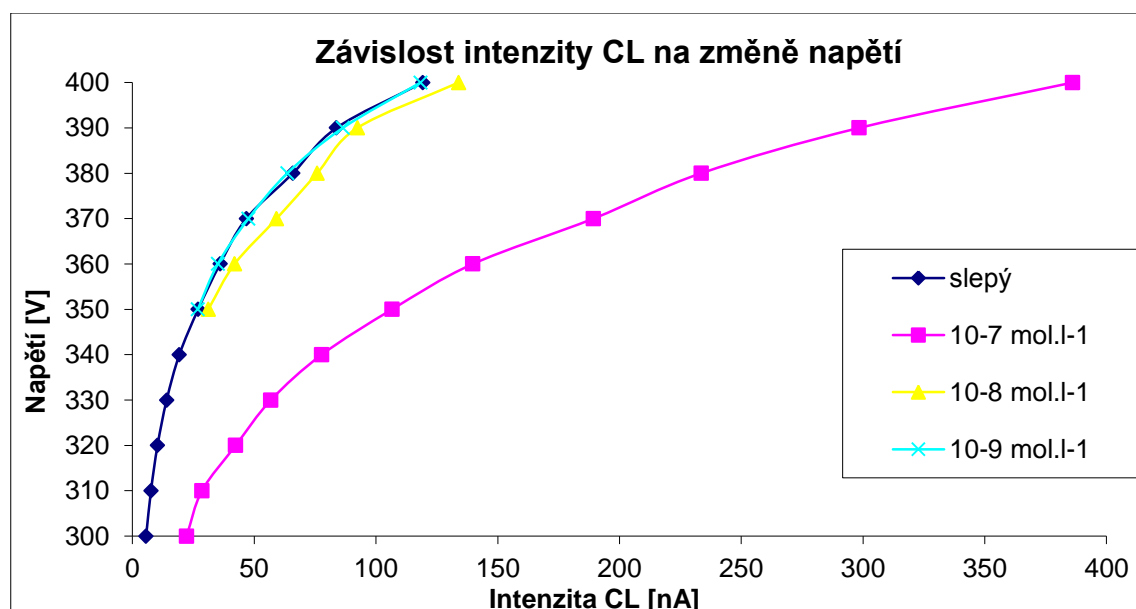
Napětí [V]	Rozsah [μ A]	Měření \bar{O}	Intenzita CL \bar{O} [nA]	SD [nA]	RSD [%]
350	0,1	0,778	31,139	0,232	0,75
360	0,1	1,049	41,948	0,394	0,94
370	0,5	0,296	59,211	3,032	5,12
380	0,2	0,948	75,841	0,483	0,64
390	0,2	1,155	92,373	2,190	2,37
400	0,2	1,674	133,944	0,386	0,29

Tabulka 15: Výsledky měření vlivu změny napětí na intenzitu CL při koncentraci železitých iontů $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Napětí [V]	Rozsah [μA]	Měření $\bar{\varnothing}$	Intenzita CL $\bar{\varnothing}$ [nA]	SD [nA]	RSD [%]
350	0,1	0,671	26,825	0,402	1,50
360	0,1	0,876	35,051	0,323	0,92
370	0,1	1,191	47,634	0,403	0,85
380	0,1	1,591	63,621	0,115	0,18
390	0,2	1,080	86,396	1,450	1,68
400	0,2	1,479	118,289	5,546	4,69

Tabulka 16: Souhrn výsledků vlivu změny napětí na CL

Napětí [V]	Průměr intenzity CL [nA]/c (Fe^{3+})			
	slepý	$10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	$10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
300	5,600	-	-	22,206
310	7,600	-	-	28,551
320	10,293	-	-	42,399
330	14,031	-	-	56,833
340	19,256	-	-	77,716
350	26,969	26,825	31,139	106,621
360	35,973	35,051	41,948	139,767
370	46,773	47,634	59,211	189,301
380	65,874	63,621	75,841	233,551
390	83,773	86,396	92,373	298,433
400	119,201	118,289	133,944	386,133



Obrázek 13: Grafické zpracování výsledků vlivu změny napětí na CL

Z grafu bylo zjištěno, že při napětí 400 V bylo umožněno nejvyšší rozlišení dvou měřených koncentrací železitých iontů (10^{-8} , 10^{-7} mol·l⁻¹) od slepého vzorku. S touto hodnotou napětí bylo dále měřeno.

Měření od kapitoly 5.1.6 byla prováděna s odstupem 9 měsíců za teplejšího a slunečnějšího počasí. Přístroje byly přestěhovány do jiné laboratoře, tím se změnilo prostředí. Byly připraveny nové roztoky. Hodnoty průtokové rychlosti byly znovu zkontrolovány.

5.1.5 Vliv koncentrace železitých iontů a měnící se rychlosti průtoku detektorem na intenzitu chemiluminiscence při napětí 400 V

Tabulka 17: Parametry měření koncentrace Fe³⁺ a měnící se rychlosti průtoku detektorem na intenzitu CL

Port 2	50 µl H ₂ O ₂ 10 ⁻³ mol·l ⁻¹
Port 3	50 µl luminol 10 ⁻³ mol·l ⁻¹
Port 4	50 µl K ₃ [Fe(CN) ₆] různé koncentrace
Pořadí aspirace roztoků	243
Napětí	400 V
Rychlost mísení	100 µl·s ⁻¹

Tabulka 18: Výsledky měření pro slepý vzorek

	Průtok detektorem [µl·s ⁻¹]	Rozsah [µA]	Měření	Ø	Intenzita CL [nA]	Ø [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	30	0,2	1,510	1,490	120,834	119,201	1,498	1,26
2.			1,494		119,552			
3.			1,465		117,216			
1.	50	0,2	1,599	1,497	127,906	119,741	5,814	4,86
2.			1,435		114,821			
3.			1,456		116,496			
1.	70	0,2	1,728	1,692	138,279	135,335	2,164	1,60
2.			1,682		134,586			
3.			1,664		133,140			
1.	90	0,5	0,787	0,760	157,370	151,914	3,859	2,54
2.			0,745		149,094			
3.			0,746		149,278			

Tabulka 19: Výsledky měření pro koncentraci železitých iontů $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

	Průtok detektorem [$\mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření	$\bar{\varnothing}$	Intenzita CL [nA]	$\bar{\varnothing}$ [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	30	1	0,896	0,885	358,544	353,852	3,318	0,94
2.			0,879		351,504			
3.			0,879		351,508			
1.	50	1	0,915	0,899	365,928	359,509	4,666	1,30
2.			0,887		354,976			
3.			0,894		357,624			
1.	70	1	0,994	0,989	397,752	395,464	1,646	0,42
2.			0,985		393,952			
3.			0,987		394,688			
1.	90	1	1,047	1,041	418,640	416,205	2,460	0,59
2.			1,043		417,140			
3.			1,032		412,836			

Tabulka 20: Výsledky měření pro koncentraci železitých iontů $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

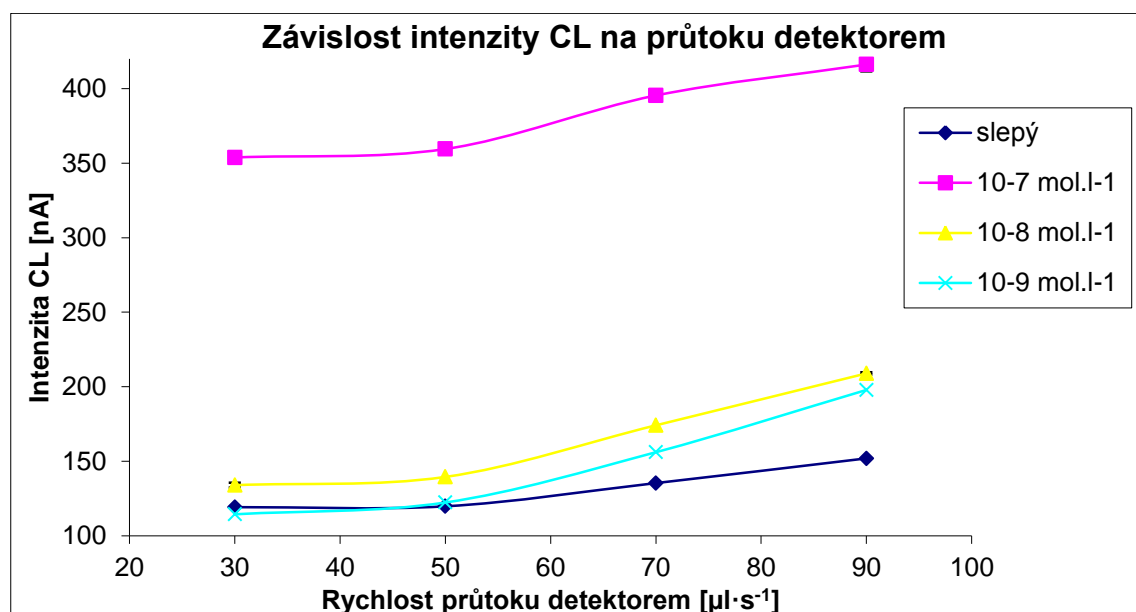
	Průtok detektorem [$\mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření	$\bar{\varnothing}$	Intenzita CL [nA]	$\bar{\varnothing}$ [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	30	0,2	1,680	1,674	134,944	133,944	0,386	0,29
2.			1,668		133,452			
3.			1,675		133,985			
1.	50	0,5	0,701	0,697	140,248	139,481	1,237	0,89
2.			0,702		140,460			
3.			0,689		137,736			
1.	70	0,5	0,880	0,870	175,978	174,093	1,384	0,80
2.			0,868		173,610			
3.			0,863		172,692			
1.	90	0,5	1,043	1,045	208,610	208,941	0,449	0,21
2.			1,048		209,576			
3.			1,043		208,638			

Tabulka 21: Výsledky měření pro koncentraci železitých iontů $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

	Průtok detektorem [$\mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření	$\bar{\varnothing}$	Intenzita CL [nA]	$\bar{\varnothing}$ [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	30	0,2	1,420	1,430	113,612	114,394	0,782	0,68
2.			1,440		115,175			
1.	50	0,2	1,558	1,529	124,619	122,312	1,704	1,39
2.			1,507		120,557			
3.			1,522		121,759			
1.	70	0,5	0,786	0,780	157,144	156,057	0,799	0,51
2.			0,779		155,782			
3.			0,776		155,246			
1.	90	0,5	0,993	0,989	198,532	197,847	1,316	0,66
2.			0,980		196,006			
3.			0,995		199,002			

Tabulka 22: Souhrn výsledků měření koncentrace Fe^{3+} a měnící se rychlosti průtoku detektorem na intenzitu CL

Průtok detektorem [$\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$]	Průměr intenzity CL [nA]/c (Fe^{3+})			
	slepý	$10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
30	119,201	114,394	133,944	353,852
50	119,741	122,312	139,481	359,509
70	135,335	156,057	174,093	395,464
90	151,914	197,847	208,941	416,205



Obrázek 14: Grafické zpracování výsledků měření koncentrace Fe^{3+} a měnící se rychlosti průtoku detektorem na intenzitu CL

Bylo zjištěno, že v případě změněných podmínek měření byla pro rozlišení jednotlivých koncentrací nejlepší rychlost průtoku detektorem $70 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. S touto hodnotou bylo dále měřeno.

5.1.6 Vliv objemu činidel na intenzitu chemiluminiscence

Tabulka 23: Parametry měření vlivu objemu činidel na intenzitu CL

Port 2	H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ *
Port 3	luminol $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ *
Port 4	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ různé koncentrace*
Pořadí aspirace roztoků	243
Napětí	330 V
Rychlost mísení	$100 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$
Průtok detektorem	$70 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$

*Změna aspirace objemu činidel a vzorků byla uvedena v následujících tabulkách.

Zde muselo být sníženo napětí na 330 V tak, abychom se vešli do rozsahu detektoru. Důvodem byla příprava peroxidu vodíku z nové šarže.

Tabulka 24: Aspirace objemu vzorku a činidel

50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o různé koncentraci								
50 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$								
50 μl luminolu $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$								
	Koncentrace Fe^{3+} [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření	\emptyset	Intenzita CL [nA]	\emptyset [nA]	s [nA]	RSD [%]
1.	slepý	1	1,582	1,488	632,740	595,391	28,536	4,79
2.			1,475		589,952			
3.			1,409		563,480			
1.	$1\cdot 10^{-9}$	1	1,437	1,422	574,924	568,679	14,243	2,50
2.			1,455		582,140			
3.			1,372		548,972			
1.	$1\cdot 10^{-8}$	1	1,378	1,348	551,158	539,021	17,059	3,16
2.			1,378		551,008			
3.			1,287		514,896			
1.	$1\cdot 10^{-7}$	1	1,806	1,798	722,304	719,315	10,471	1,46
2.			1,826		730,380			
3.			1,763		705,260			

Tabulka 25: Aspirace objemu vzorku a činidel

50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o různé koncentraci								
30 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$								
50 μl luminolu $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$								
	Koncentrace Fe^{3+} [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření	\emptyset	Intenzita CL [nA]	\emptyset [nA]	s [nA]	RSD [%]
1.	slepý	0,5	1,043	1,022	208,628	204,472	4,156	2,03
2.			1,002		200,316			
1.	$1\cdot 10^{-9}$	0,5	0,985	0,979	196,992	195,819	4,094	2,09
2.			1,001		200,142			
3.			0,952		190,322			
1.	$1\cdot 10^{-8}$	0,5	0,884	0,877	176,844	175,435	1,409	0,80
2.			0,870		174,026			
1.	$1\cdot 10^{-7}$	0,5	1,036	1,015	207,124	202,952	4,826	2,38
2.			1,028		205,544			
3.			0,981		196,188			

Tabulka 26: Aspirace objemu vzorku a činidel

50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o různé koncentraci								
40 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$								
50 μl luminolu $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$								
	Koncentrace Fe^{3+} [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření	\emptyset	Intenzita CL [nA]	\emptyset [nA]	s [nA]	RSD [%]
1.	slepý	1	0,700	0,694	279,828	277,443	3,035	1,09
2.			0,683		273,160			
3.			0,698		279,340			
1.	$1\cdot 10^{-9}$	1	0,590	0,583	236,016	233,118	2,898	1,24
2.			0,576		230,220			
1.	$1\cdot 10^{-8}$	1	0,544	0,551	217,424	220,414	2,990	1,36
2.			0,559		223,404			
1.	$1\cdot 10^{-7}$	1	0,528	0,529	211,300	211,749	5,687	2,69
2.			0,513		205,020			
3.			0,547		218,928			

Tabulka 27: Aspirace objemu vzorku a činidel

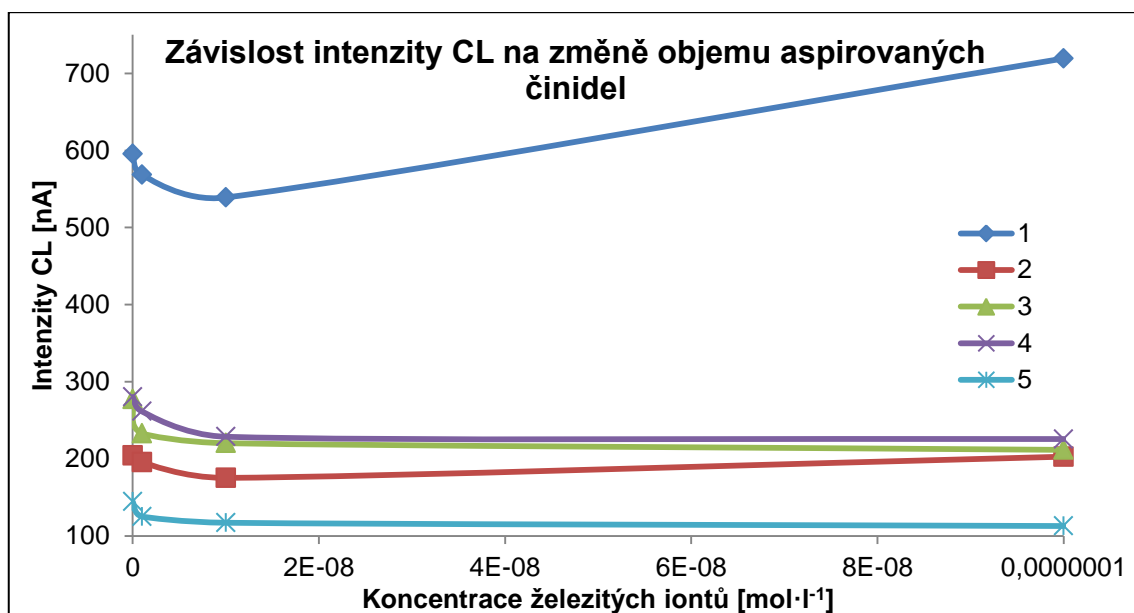
50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o různé koncentraci								
30 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$								
30 μl luminolu $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$								
	Koncentrace Fe^{3+} [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření	\emptyset	Intenzita CL [nA]	\emptyset [nA]	s [nA]	RSD [%]
1.	slepý	0,5	1,409	1,402	281,714	280,379	3,601	1,28
2.			1,420		283,968			
3.			1,377		275,456			
1.	$1\cdot 10^{-9}$	0,5	1,496	1,308	299,246	261,579	26,886	10,28
2.			1,191		238,250			
3.			1,236		247,242			
1.	$1\cdot 10^{-8}$	1	0,596	0,572	238,272	228,765	8,014	3,50
2.			0,547		218,668			
3.			0,573		229,356			
1.	$1\cdot 10^{-7}$	1	0,582	0,564	232,856	225,795	8,269	3,66
2.			0,576		230,336			
3.			0,535		214,192			

Tabulka 28: Aspirace objemu vzorku a činidel

70 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o různé koncentraci								
50 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$								
50 μl luminolu $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$								
	Koncentrace Fe^{3+} [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření	\emptyset	Intenzita CL [nA]	\emptyset [nA]	s [nA]	RSD [%]
1.	slepý	0,2	1,755	1,808	140,424	144,668	4,258	2,94
2.			1,881		150,490			
3.			1,789		143,090			
1.	$1\cdot 10^{-9}$	0,2	1,608	1,567	128,640	125,326	2,423	1,93
2.			1,555		124,421			
3.			1,536		122,917			
1.	$1\cdot 10^{-8}$	0,2	1,548	1,465	123,840	117,233	4,750	4,05
2.			1,437		114,959			
3.			1,411		112,898			
1.	$1\cdot 10^{-7}$	0,2	1,458	1,412	116,674	112,990	2,807	2,48
2.			1,405		112,430			
3.			1,373		109,866			

Tabulka 29: Souhrn výsledků měření vlivu objemu činidel na intenzitu CL

	Aspirace [μl]	Průměr intenzity CL [nA]]/c (Fe^{3+})			
		slepý	$10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
1.	50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, H_2O_2 , luminolu	595,391	568,679	539,021	719,315
2.	50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, luminolu, 30 μl H_2O_2	204,472	195,819	175,435	202,952
3.	50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, luminolu, 40 μl H_2O_2	277,443	233,118	220,414	211,749
4.	50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 30 μl H_2O_2 , luminolu	280,379	261,579	228,765	225,795
5.	70 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 50 μl H_2O_2 , luminolu	144,668	125,326	117,233	112,990



Obrázek 15: Grafické zpracování výsledků měření vlivu objemu činidel na intenzitu CL

Tento krok optimalizace byl zaměřen na stanovení velmi nízkých koncentrací, proto byly porovnávány pouze koncentrace v rozmezí $1 \cdot 10^{-9}$ – $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nejvyšší intenzita CL byla naměřena při aspiraci 50 μl všech činidel a vzorků (1. kombinace uvedená v tabulce 29). Se zvyšující koncentrací by se měla zvyšovat intenzita CL, k čemuž při těchto měřeních nedocházelo u velmi nízkých koncentrací $1 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, kde byla intenzita CL slepého roztoku dokonce vyšší než uvedené koncentrace. Nárůst CL byl patrný jen u první kombinace objemů použitých roztoků a v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

5.1.7 Vliv promísení obrácením směru toku nosného proudu před průchodem detektorem na intenzitu CL

Tabulka 30: Parametry měření

Port 2	50 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Port 3	50 μl luminol $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Port 4	50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ různé koncentrace
Port 6	100 μl nosného proudu
Pořadí aspirace roztoků bez promísení	243
Pořadí aspirace roztoků s promísením	2436
Rychlost mísení	$100 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$

Nebylo možné zachovat předchozí velikost napětí. Čerstvě připravený roztok peroxidu vodíku byl nestabilní. Z počátku měření bylo nutné hodnotu napětí snížit, aby se naměřené hodnoty vešly do rozsahu detektoru. Stabilitu tohoto roztoku jsme se snažily udržet chlazením a použitím tmavého laboratorního skla.

Tabulka 31: Výsledky měření bez opakované změny směru toku

Napětí			275 V		
Rychlost průtoku detektorem			$70 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$		
Koncentrace Fe^{3+} [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření \bar{x}	Intenzita CL \bar{x} [nA]	SD [nA]	RSD [%]
slepý	0,5	1,494	298,733	10,015	3,35
$1 \cdot 10^{-9}$	1	0,842	336,600	5,800	1,72
$1 \cdot 10^{-8}$	1	1,339	535,467	12,187	2,28
$1 \cdot 10^{-7}$	1	1,526	610,354	12,890	2,11

Tabulka 32: Výsledky měření s opakovanou změnou směru toku a zvýšením průtoku detektorem

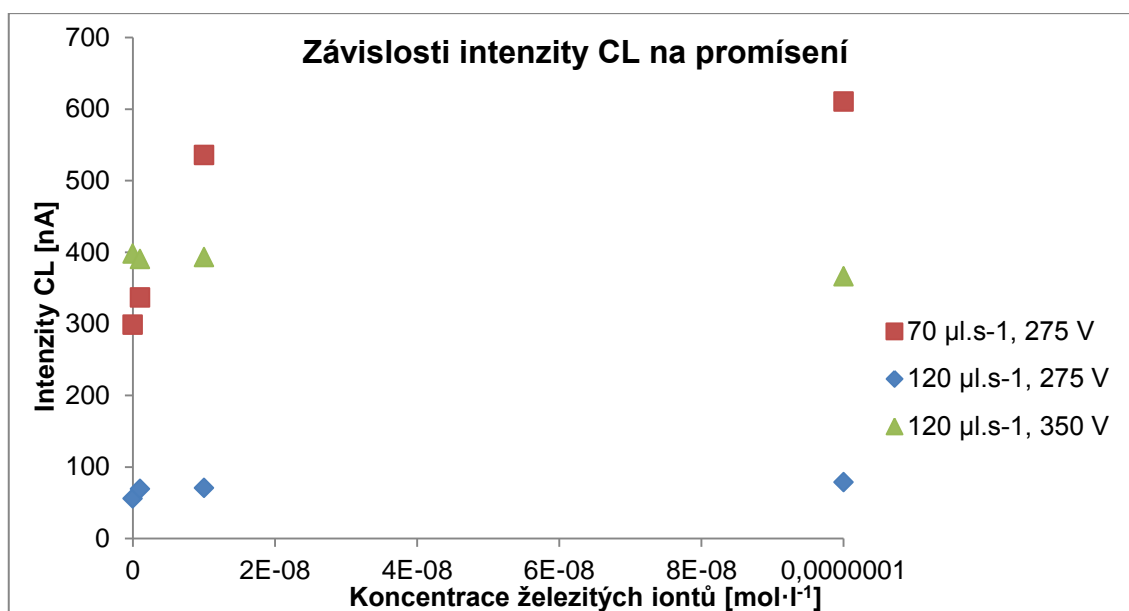
Napětí			275 V		
Rychlost průtoku detektorem			120 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$		
Koncentrace Fe^{3+} [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření \emptyset	Intenzita CL \emptyset [nA]	SD [nA]	RSD [%]
slepý	0,2	0,699	55,893	3,267	5,84
$1\cdot 10^{-9}$	0,1	1,729	69,147	69,147	1,80
$1\cdot 10^{-8}$	0,2	0,882	70,587	2,244	3,18
$1\cdot 10^{-7}$	0,2	0,986	78,853	0,425	0,54

Tabulka 33: Výsledky měření s opakovanou změnou směru toku a zvýšením napětí

Napětí			350 V		
Rychlost průtoku detektorem			120 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$		
Koncentrace Fe^{3+} [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Rozsah [μA]	Měření \emptyset	Intenzita CL \emptyset [nA]	SD [nA]	RSD [%]
slepý	1	0,995	398,000	6,101	1,53
$1\cdot 10^{-9}$	1	0,976	390,533	18,317	4,69
$1\cdot 10^{-8}$	1	0,982	392,800	2,286	0,58
$1\cdot 10^{-7}$	1	0,915	366,000	5,494	1,50

Tabulka 34: Souhrn výsledků se změnou směru toku nosného proudu

	Promísení opakovanou změnou směru toku; Průtok detektorem / napětí	Průměr intenzity CL [nA] /c (Fe^{3+})			
		slepý	$10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
1	Beze změny toku; 70 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ / 275 V	298,733	336,600	535,467	610,354
2	Se změnou toku; 120 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ / 275 V	55,893	69,147	70,587	78,853
3	Se změnou toku; 120 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ / 350 V	398,000	390,533	392,800	366,000



Obrázek 16: Grafické zpracování výsledků vlivu promísení na intenzitu CL

Porovnáním hodnot bylo zjištěno, že opakovaná změna směru toku nebyla výhodná. Došlo ke snížení intenzity CL díky opožděnému průtoku detektorem. Nepomohlo ani zvýšení rychlosti průtoku detektorem. Bylo vyzkoušeno vyšší napětí, ale výsledky byly srovnatelné s nižším napětím, jen s vyšší naměřenou intenzitou CL. Nedocházelo ani ke zvyšování intenzity CL v důsledku zvyšující se koncentrace železitých iontů. To mohlo být způsobeno rozmytím reagující zóny a nedostatečnou reakcí činidel a železitých iontů.

5.2 Kalibrační závislost

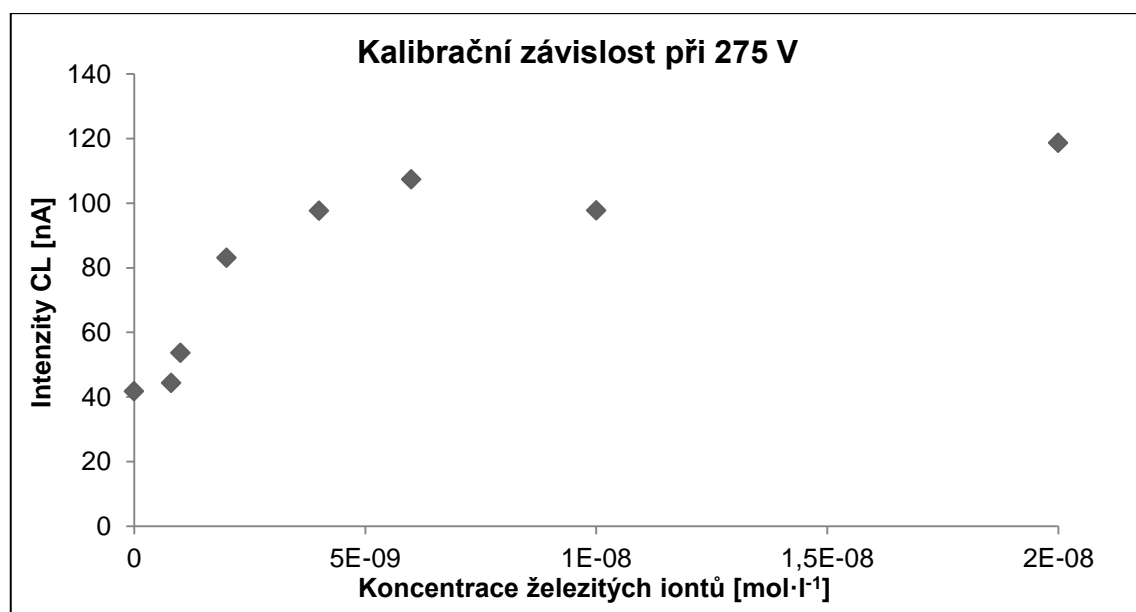
Byla proměřena kalibrační závislost podle optimalizovaných parametrů při pracovním napětí 275 V a 350 V.

Tabulka 35: Parametry měření kalibrační závislosti

Port 2	50 μl H ₂ O ₂ 10 ⁻³ mol·l ⁻¹
Port 3	50 μl luminol 10 ⁻³ mol·l ⁻¹
Port 4	50 μl K ₃ [Fe(CN) ₆] různé koncentrace
Pořadí aspirace roztoků	243
Rychlost průtoku detektorem	70 μl·s ⁻¹
Rychlost mísení	100 μl·s ⁻¹

Tabulka 36: Kalibrační závislost při napětí 275 V

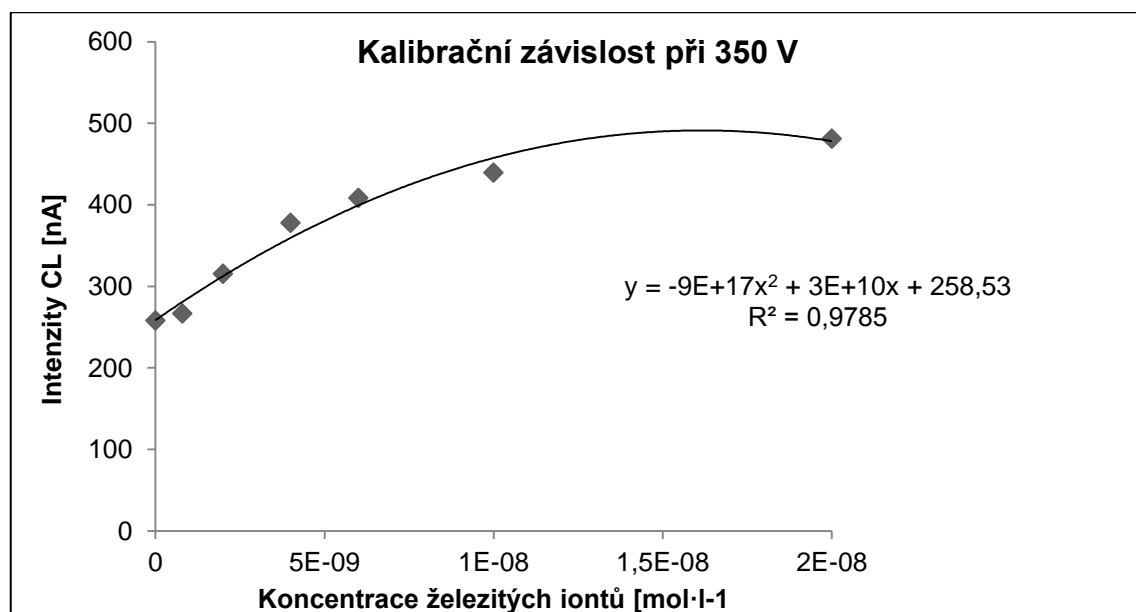
	Koncentrace Fe^{3+} [mol·l ⁻¹]	Rozsah [nA]	Měření	Ø	Intenzita CL [nA]	Ø [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	Slepý	0,1	1,041	1,043	41,640	41,733	0,511	1,22
2.			1,060		42,400			
3.			1,029		41,160			
1.	$8 \cdot 10^{-10}$	0,1	1,077	1,107	43,080	44,293	0,858	1,94
2.			1,122		44,880			
3.			1,123		44,920			
1.	$1 \cdot 10^{-9}$	0,1	1,404	1,342	56,160	53,693	1,868	3,48
2.			1,332		53,280			
3.			1,291		51,640			
1.	$2 \cdot 10^{-9}$	0,2	1,044	1,038	83,520	83,040	0,346	0,42
2.			1,036		82,880			
3.			1,034		82,720			
1.	$4 \cdot 10^{-9}$	0,2	1,216	1,220	97,280	97,627	1,813	1,86
2.			1,195		95,600			
3.			1,250		100,000			
1.	$6 \cdot 10^{-9}$	0,2	1,292	1,439	103,360	107,360	2,840	2,65
2.			1,371		109,680			
3.			1,363		109,040			
1.	$1 \cdot 10^{-8}$	0,2	1,210	1,222	96,800	97,787	0,852	0,87
2.			1,221		97,680			
3.			1,236		98,880			
1.	$2 \cdot 10^{-8}$	0,2	1,443	1,483	115,440	118,613	2,312	1,95
2.			1,494		119,520			
3.			1,511		120,880			



Obrázek 17: Grafické zpracování výsledků kalibrační závislosti při napětí 275 V

Tabulka 37: Kalibrační závislost při napětí 350 V

	Koncentrace Fe^{3+} [mol·l ⁻¹]	Rozsah [nA]	Měření	Ø	Intenzita CL [nA]	Ø [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	Slepý	0,5	1,289	1,290	257,800	257,933	6,533	2,53
2.			1,330		266,000			
3.			1,250		250,000			
1.	$8 \cdot 10^{-10}$	0,5	1,399	1,333	279,800	266,667	9,716	3,64
2.			1,318		263,600			
3.			1,283		256,600			
1.	$2 \cdot 10^{-9}$	0,5	1,618	1,577	323,600	315,400	7,972	2,53
2.			1,523		304,600			
3.			1,590		318,000			
1.	$4 \cdot 10^{-9}$	1	0,932	0,989	372,800	377,733	23,934	6,34
2.			1,023		409,200			
3.			0,878		351,200			
1.	$6 \cdot 10^{-9}$	1	1,015	1,021	406,000	408,400	4,572	1,12
2.			1,011		404,400			
3.			1,037		414,800			
1.	$1 \cdot 10^{-8}$	1	1,147	1,099	458,800	439,467	23,493	5,35
2.			1,133		453,200			
3.			1,016		406,400			
1.	$2 \cdot 10^{-8}$	1	1,156	1,202	462,400	480,933	13,106	2,73
2.			1,225		490,000			
3.			1,226		490,400			



Obrázek 18: Grafické zpracování výsledků kalibrační závislosti při napětí 350 V

5.2.1 Kalibrační závislost

Kalibrační závislost roztoku železitých iontů za standardizovaných podmínek je polynomického tvaru.

Rovnice a korelační koeficient byly vypočítány:

$$y = -9 \cdot 10^{17} x^2 + 3 \cdot 10^{10} x + 258,53$$

$$R^2 = 0,9785$$

Nebyla nalezena lineární oblast s dostatečně vysokým korelačním koeficientem, proto byla použita polynomická kalibrační závislost druhého řádu.

5.2.2 Kvantifikační a detekční limity

Detekční limit byl vypočten z velikosti slepého signálu a velikosti šumu: Výška píku slepého signálu odpovídala hodnotě 1,290 a byla změřena při 350 V, citlivosti detektoru 0,5 μA , což odpovídá intenzitě CL 257,933 nA.

Velikost šumu odpovídala hodnotě 0,011 a byla změřena při 350 V, citlivosti detektoru 0,5 μA , což odpovídá intenzitě CL 2,200 nA.

Detekční limit je součet trojnásobku šumu a slepého signálu:

$$(3 \cdot 2,200) + 257,933 = 264,533 \text{ nA} \quad \sim \quad 7,48 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

Kvantifikační limit je součet desetinásobku šumu a slepého signálu:

$$(10 \cdot 2,200) + 257,933 = 279,933 \text{ nA} \quad \sim \quad 1,26 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

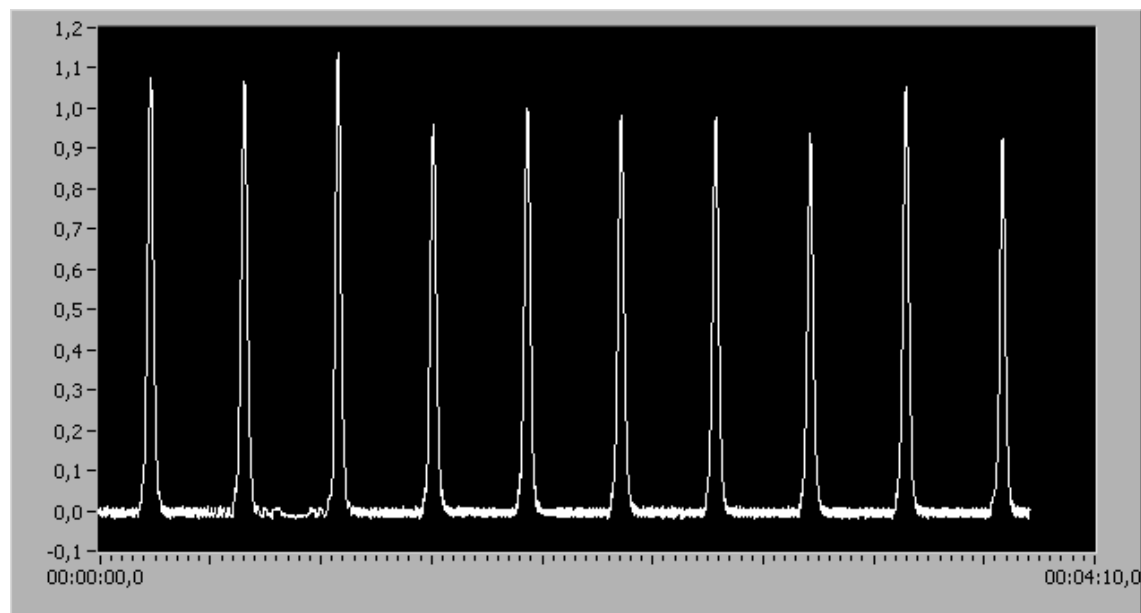
Lineární oblast roztoku Fe^{3+} iontů za standardních podmínek nebyla nalezena s dostatečně vysokým korelačním koeficientem, proto byla použita polynomická kalibrační závislost druhého řádu. Hodnoty detekčního a kvantifikačního limitu byly vypočítány z posledních tří hodnot kalibrace. Byla vypočítána velikost detekčního limitu, která se rovná 264,533 nA, což odpovídá koncentraci $7,48 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Fe^{3+} iontů, hodnota kvantifikačního limitu je 279,933 nA $\sim 1,26 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Fe^{3+} iontů.

5.3 Opakovatelnost

Byla měřena opakovatelnost stanovení železitých iontů podle optimalizovaného měřícího cyklu.

Tabulka 38: Opakovatelnost stanovení Fe^{3+} iontů u koncentrací $2 \cdot 10^{-9}$ a $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při napětí 350 V

Koncentrace $\text{Fe}^{3+} [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$	$2 \cdot 10^{-9}$	$4 \cdot 10^{-9}$
Měření / Rozsah [μA]	0,5	1
1.	1,618	1,065
2.	1,523	1,018
3.	1,590	1,099
4.	1,475	0,948
5.	1,585	1,003
6.	1,538	0,960
7.	1,458	0,967
8.	1,653	0,932
9.	1,565	1,023
10.	1,514	0,878
\bar{x}	1,552	0,989
SD	0,059	0,062
RSD [%]	3,79	6,28



Obrázek 19: Záznam měření opakovatelnosti stanovení Fe^{3+} iontů u koncentrace $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při napětí 350 V

Pro koncentraci $2 \cdot 10^{-9}$ Fe^{3+} iontů za standartních podmínek je relativní směrodatná odchylka rovna 3,79 %.

Pro koncentraci $4 \cdot 10^{-9}$ Fe^{3+} iontů za standartních podmínek je relativní směrodatná odchylka rovna 6,28 %.

5.4 Porovnání intenzity CL různých železitých sloučenin

Tabulka 39: Parametry měření intenzity CL různých Fe^{3+} sloučenin

Port 2	$50 \mu\text{l H}_2\text{O}_2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Port 3	$50 \mu\text{l luminol} \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Port 4	$50 \mu\text{l}$ různé sloučeniny Fe^{3+} o koncentraci $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Pořadí aspirace roztoků	243
Napětí	350 V
Rychlost mísení	$100 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$

Všechny hodnoty byly měřeny třikrát a do tabulky byla uvedena průměrná hodnota.

Tabulka 40: Porovnání intenzity CL různých Fe^{3+} sloučenin o koncentraci $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při rychlosti průtoku detektorem $70 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$

Sloučenina	Rozsah [nA]	Měření Ø 1. pík	Měření Ø 2. pík	Intenzita CL Ø [nA]	SD [nA]	RSD [%]
Slepý	1	0,948	-	391,067	9,331	2,39
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	1	1,626	-	650,533	24,292	3,73
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	1	1,140	0,216*	456,000	6,532	1,43
FeCl_3	1	0,819	0,120*	327,600	19,019	5,81

* Naměřené hodnoty byly odečteny z programu ručně kvůli příliš nízké intenzitě CL.

U dusičnanu železitého a chloridu železitého došlo ke vzniku dvou píků. Proto bylo vyzkoušeno zvýšení rychlosti průtoku detektorem na $100 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$.

Tabulka 41: Porovnání intenzity CL různých Fe^{3+} sloučenin o koncentraci $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při rychlosti průtoku detektorem $100 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$

	Sloučenina	Rozsah [nA]	Měření	Ø	Intenzita CL [nA]	Ø [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	Slepý	0,5	1,289	1,290	257,800	257,933	6,533	2,53
2.			1,330		266,000			
3.			1,250		250,000			
1.	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	0,5	1,399	1,333	279,800	266,667	9,716	3,64
2.			1,318		263,600			
3.			1,283		256,600			
1.	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	0,5	1,086	1,039	217,200	207,867	6,650	3,20
2.			1,021		204,200			
3.			1,011		202,200			
1.	FeCl_3	0,5	1,618	1,577	323,600	315,400	7,972	2,53
2.			1,523		304,600			
3.			1,590		318,000			

Metoda byla optimalizována na katalytické působení hexakyanoželezitanu draselného při oxidaci luminolu peroxidem vodíku v alkalickém prostředí. Byl porovnáván rozdíl mezi intenzitou CL u různých železitých sloučenin. Dusičnan železitý vykazoval ve stejné koncentraci jako hexakyanoželezitan draselný nižší intenzitu CL a chlorid železitý vyšší intenzitu CL. Rozdíly mohly být způsobeny tím, že jiné anionty ovlivnily reakci buď pozitivně, nebo negativně. V dalším pokračování experimentální práce bude nutno ověřit vliv různých aniontů na toto stanovení.

5.5 Vliv železnatých iontů na intenzitu CL při stanovení železitých iontů

Tabulka 42: Parametry měření vlivu železnatých iontů na stanovení železitých iontů

Port 2	$50 \mu\text{l H}_2\text{O}_2 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Port 3	$50 \mu\text{l luminol } 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Port 4	$50 \mu\text{l různé sloučeniny } \text{Fe}^{3+} \text{ a } \text{Fe}^{2+} \text{ o koncentraci } 4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Pořadí aspirace roztoků	243
Napětí	350 V
Rychlost mísení	$100 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$
Rychlost průtoku detektorem	$100 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$
Rozsah	1 nA

Tabulka 43: Vlivu železnatých iontů na stanovení železitých iontů

	Sloučenina	Měření	Ø	Intenzita CL [nA]	Ø [nA]	SD [nA]	RSD [%]
1.	Slepý	1,493	1,492	597,200	596,800	17,802	2,98
2.		1,546		618,400			
3.		1,437		574,800			
1.	K ₃ [Fe(CN) ₆]	1,711	1,702	684,400	680,667	1,458	0,65
2.		1,686		674,400			
3.		1,708		683,200			
1.	K ₄ [Fe(CN) ₆]	2,065	2,087	826,000	834,933	7,038	0,84
2.		2,089		835,600			
3.		2,108		843,200			
1.	K ₃ [Fe(CN) ₆]: K ₄ [Fe(CN) ₆] 1:1	2,888	2,979	1155,200	1191,600	26,232	2,20
2.		3,009		1203,600			
3.		3,040		1216,000			

Největší vliv na intenzitu CL byl zjištěn u železnatých iontů, což se předpokládalo. Byl potvrzen aditivní charakter intenzity CL při kombinaci těchto iontů v jednom roztoku. Pro současné stanovení by bylo nutno nejprve separovat železnaté ionty od železitých (např. iontovou chromatografií) a až poté použít CL detekce (postkolonová derivatizace separovaných iontů).

6 Souhrn

Z měření vyplynuly následující výsledky:

Tabulka 44: Souhrn

Optimalizace	Rozmezí	Nejvhodnější
Sekvence	Všechny kombinace	50 μl H_2O_2 $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 50 μl luminol $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Rychlost mísení při napětí 190 V	30 - 150 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$
Rychlost průtoku detektorem při 190 V	30 - 60 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$	30 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$
Rychlost průtoku detektorem při 400 V	30 - 90 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$	70 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$
Pracovní napětí detektoru	190, 275 – 400 V	350 V
Objemy činidel	30, 40, 50 μl H_2O_2 50, 70 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 30, 50 μl luminolu	50 μl H_2O_2 50 μl $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 50 μl luminolu
Dodatečné promísení	100 μl nosného proudu	nevýhodné
Rozmezí kalibrace		$8\cdot 10^{-10} - 2\cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Detekční limit		264,533 nA $\sim 7,48\cdot 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Kvantifikační limit		279,933 nA $\sim 1,26\cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
Různé železité sloučeniny	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ FeCl_3	nižší intenzita vyšší intenzita
Vliv Fe^{2+} iontů na stanovení Fe^{3+} iontů	$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	naměřena intenzita CL o 18,48 % vyšší než $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ aditivní vliv

Optimalizace systému

Sekvence

Nejprve byla optimalizována sekvence. Byly vyzkoušeny všechny kombinace aspirace vzorku a činidel. Nejvýhodnější sekvence byla v pořadí: peroxid vodíku, hexakynoželezitan draselný a luminol.

Rychlost mísení a průtoku detektorem při 190

Byly zkoušeny různé rychlosti v rozmezí uvedeném v tabulce 44. Rychlost mísení byla nejvýhodnější při 100 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ a rychlost průtoku detektorem při 30 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$.

Rychlost průtoku detektorem při 400 V

Po zvýšení napětí byla ještě jednou přeměřena rychlost průtoku detektorem, tentokrát při vyšším rozsahu (30, 50, 70 a 90 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$). Nejvýhodnější byla rychlost průtoku detektorem 70 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$.

Pracovní napětí detektoru

Byla snaha o použití stejně vysokého napětí. Nejdříve bylo náhodně zvoleno napětí 190 V. Kvůli lepšímu rozlišení bodů různých koncentrací bylo napětí zvyšováno až na hodnotu 400 V, tato hodnota se jevila optimální k měření. Poté došlo ke změně prostředí, podmínek měření a přípravě nových roztoků. Byla použita nová šarže peroxidu vodíku a hodnota napětí musela být snížena.

Objemy činidel:

Byly aspirovány různé objemy činidel. Nejvýhodnější však byly počáteční objemy činidel 50 μl .

Promísení

Porovnáním hodnot bylo zjištěno, že opakovaná změna směru toku nebyla výhodná. Došlo ke snížení intenzity CL díky opožděnému průtoku detektorem. Nepomohlo ani zvýšení rychlosti průtoku detektorem. Bylo vyzkoušeno vyšší napětí, ale výsledky byly srovnatelné s nižším napětím, jen s vyšší naměřenou intenzitou CL.

Kalibrační závislost

Lineární oblast roztoku Fe^{3+} iontů za standardních podmínek pro kalibrační rozmezí $8\cdot 10^{-10} - 2\cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebyla nalezena s dostatečně vysokým korelačním koeficientem, proto byla použita polynomická kalibrační závislost druhého řádu. Byla vypočítána velikost detekčního limitu, která se rovná 264,533 nA, což odpovídá koncentraci $7,48\cdot 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} iontů, hodnota kvantifikačního limitu je 279,933 nA $\sim 1,26\cdot 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe^{3+} iontů.

Opakovatelnost

Pro koncentraci $2 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$ iontů za standartních podmínek je relativní směrodatná odchylka rovna 3,79 %.

Pro koncentraci $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$ iontů za standartních podmínek je relativní směrodatná odchylka rovna 6,28 %.

Různé železité sloučeniny

U dusičnanu železitého a chloridu železitého došlo ke vzniku dvou píků. Proto bylo vyzkoušeno zvýšení rychlosti průtoku detektorem na $100 \mu\text{l} \cdot \text{s}^{-1}$. Dusičnan železitý vykazoval ve stejné koncentraci jako hexakynoželezitan draselný nižší intenzitu CL a chlorid železitý vyšší intenzitu CL. Rozdíly mohly být způsobeny tím, že jiné anionty ovlivnily reakci buď pozitivně, nebo negativně. V dalším pokračování experimentální práce bude nutno ověřit vliv různých aniontů na toto stanovení.

Vliv železnatých iontů na stanovení železitých iontů

Největší vliv na intenzitu CL byl zjištěn u železnatých iontů, což se předpokládalo. Byl potvrzen aditivní charakter intenzity CL při kombinaci těchto iontů v jednom roztoku.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo testovat vliv nízkých koncentrací (10^{-7} až 10^{-9} mol·l⁻¹) železitých iontů ve formě hexakyanoželezitanu draselného v SIA systému pomocí chemiluminiscenční detekce a optimalizovat toto stanovení v průtokovém systému. Nalezená kalibrační závislost měřená za optimalizovaných podmínek byla vyhodnocena nelineární regresí v rozmezí $8 \cdot 10^{-10}$ – $2 \cdot 10^{-8}$ mol·l⁻¹ Fe³⁺ iontů. Limit detekce a kvantifikace byl 264,533 nA a 279,933 nA. Opakovatelnost stanovení hodnocena na dvou koncentračních hladinách byla pro koncentraci $2 \cdot 10^{-9}$ mol·l⁻¹ Fe³⁺ 3,79 % a pro koncentraci $4 \cdot 10^{-9}$ mol·l⁻¹ Fe³⁺ 6,28 %. Rychlost stanovení odpovídá 40 vzorkům za hodinu, pokud je každý vzorek nastříkovan 3x.

8 Seznam použité literatury

- [1] Páscoa, R. N. M. J.; Tóth, I. V.; Rangel, A. O. S. S. A multi-syringe flow injection system for the spectrophotometric determination of trace levels of iron in waters using a liquid waveguide capillary cell and different chelating resins and reaction chemistries. *Microchem. J.* **2009**, 93, 153–158.
- [2] Paseková, H.; Polášek, M.; Solich, P. Sekvenční injekční analýza. *Chem. Listy*. **1999**, 93, 354-359.
- [3] Lenehan, C. E.; Barnett, N. W.; Lewis, S. W. Sequential injection. *Analyst*, **2002**, 127, 997–1020.
- [4] Paseková, H.; Polášek, M. Determination of procaine, benzocaine and tetracaine by sequential injection analysis with permanganate-induced chemiluminescence detection. *Talanta*, **2000**, 52, 67–75.
- [5] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P. *Spektrometrické analytické metody I.*, 2th ed.; Karolinum: Praha, CZ, 1997, pp. 115-116.
- [6] Mervartová, K.; Polášek, M.; Calatayud, M. J. Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 45, 367-381.
- [7] Kořínková, M. *Diplomová práce: Studium vlivu chinonů a Quantum Dots částic na průběh chemiluminiscenčních reakcí*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové UK v Praze: Hradec Králové, CZ, 2011.
- [8] Barni, F.; Lewis, S. W.; Berti, A.; Miskelle G. M.; Lago, G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* **2007**, 72, 896–913.

-
- [9] Sklenářová, H. Úvod a luminiscenční metody <https://docs.faf.cuni.cz/KACH/?path=farmacie%5cspeci%C3%A1ln%C3%AD+metody+instrument%C3%A1ln%C3%AD+anal%C3%BDy%5cp%C5%99edn%C3%A1%C5%A1ky>. (1.6.2012)
- [10] Šimůnek, O. Chemiluminiscence: http://chemiluminiscence.xf.cz/chemiluminiscence_II_final.pdf (23.7.2013)
- [11] Andac, M.; Asan, A.; Isildak, I. A simple flow injection spectrophotometric determination method for iron(III) based on O-acetylsalicylhydroxamic acid complexation. *Chem. Listy*, **2009**, 63, 268–273.
- [12] Hansen, E. H.; Miró, M. How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses. *Trends Anal. Chem.*, **2007**, 26, 18-26
- [13] Mansour, F. R.; Danielson, N. D. Reverse flow-injection analysis. *Trends Anal. Chem.*, **2012**, 40, 1-14.
- [14] Ruengsitagoon, W. Reverse flow injection spectrophotometric determination of iron(III) using chlortetracycline reagent. *Talanta*, **2008**, 74, 1236-1241.
- [15] Du, Y.; Chen, M.; Zhang, Y.; Luo, F.; He C.; Li, M.; Chen, X. Determination of iron(III) based on the fluorescence quenching of rhodamine B derivative. *Talanta*, **2013**, 106, 261–265.
- [16] Shervedani, R. K.; Hatefi-Mehrjardi A.; Asadi-Firsani A. Sensitive determination of iron(III) by gold electrode modified with 2-mercaptop succinic acid self-assembled monolayer. *Anal. Chim. Acta.*, **2007**, 601, 164-171.
- [17] Horáková, M. *Diplomová práce: Optimalizace SIA stanovení dakarbazinu*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové UK v Praze: Hradec Králové, CZ, 2010.